

Universität Duisburg-Essen

**Untersuchung des Reaktionsmechanismus
von Rinderleberkatalase**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat. -

im Fachbereich Chemie

der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Oliver Auferkamp

aus Bochum

2007

Referent: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

Korreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. R. Sustmann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.01.2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von 13.03.2003 bis 31.03.2006 am Institut für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums Essen. Für den Vorschlag zu dieser Dissertation, bei der Durchführung der Versuche und für die wertvollen Ratschläge, die mir bei der Erstellung dieser wissenschaftlichen Arbeit geholfen haben, gilt mein besonderer Dank dem Leiter dieses Institutes

Herrn Prof. Dr. Dr. Herbert de Groot

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank dem Leiter des Institutes für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen für das gewährte Interesse an dem Thema, die Diskussionsbereitschaft und die Übernahme des Korreferates für diese Arbeit

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. Reiner Sustmann

Ebenfalls vom Institut für Organische Chemie der Universität Duisburg-Essen danke ich Herrn Dr. H.-G. Korth für die sehr große Diskussionsbereitschaft.

Vom Universitätsklinikum Essen danke ich weiterhin Herrn Priv. Doz. Dr. M. Kirsch für die vielen Ratschläge und Ideen zur Optimierung der Versuche.

Mein Dank gilt auch besonders Frau A. Wensing für die große Hilfestellung bei der Einarbeitung an den verschiedenen Apparaturen und für das tolle Arbeitsklima im Labor.

Herrn Dr. T. Bramey danke ich für die gewährte Hilfe, das nette Klima in unserem kleinen Schreibraum und für den freundschaftlichen Kontakt, was natürlich auch für seine Freundin, Frau K. Pamp, gilt.

Für das angenehme Arbeitsklima und die vielen Hilfen bzw. Ratschläge danke ich außerdem Frau Dr. U. Kerkweg, Frau Dr. S.G.E. Meyer, Frau B. Lammers, Frau J. Fieker, Frau M. Brachvogel, Frau W. Diesner, Frau E. Hillen, Frau A. Kytzia, Frau S. Liebeskind, Frau K. Sonnenschein, Frau J. Arnold-Thomas, Herrn Dr. F. Petrat, Herrn F. Homann, Herrn S. Klempt, Herrn K. Müller, allen ehemaligen Mitarbeitern und allen Gast-Mitarbeitern.

Besonderer Dank gilt meiner Familie, meiner Freundin Regina sowie allen meinen Freunden und Bekannten, die nicht nur während der Zeit dieser Promotion für mich da waren.

Diese Arbeit wurde teilweise durch die DFG im Rahmen des SFB-452 gefördert.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1	Katalase.....	5
1.2.	Funktion der Katalase.....	8
1.3.	Struktur des Enzyms.....	10
1.4.	Bedeutung der Katalase für die Zelle sowie technische Anwendung.....	17
1.5.	Bestimmungsmöglichkeiten der Katalaseaktivität.....	18
2.	Fragestellung.....	20
3.	Ergebnisse.....	21
3.1.	Abhängigkeit der katalatischen Sauerstoffproduktion von der eingestellten H_2O_2 steady-state-Konzentrationen.....	21
3.2.	Bildung von Compound-I, -II, -III bei verschiedenen $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen.....	24
3.3.	Untersuchung der Absorption (405 nm) bei niedrigen bzw. hohen $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen.....	26
3.4.	Untersuchung der katalytischen Aktivität nach Inkubation von Rinderleberkatalase mit unterschiedlichen $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen.....	28
3.5.	Oxidation des synthetischen Peroxidasesubstrates Rhodamin-123 in Gegenwart unterschiedlicher $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse bei An- bzw. Abwesenheit von Additiven.....	32
3.6.	Effizienz der Dihydrorhodamin-123-Oxidation durch Compound-I in Gegenwart verschiedener Additive (Ascorbinsäure bzw. NADPH).....	35
3.7.	Bestimmung der Compound-I-Abbaurate (k_{app}) in Gegenwart verschiedener Additiven (Ascorbinsäure, NADPH u. Ethanol).....	37
3.8.	Additive-abhängige Compound-II Bildung bei konstanten H_2O_2 -Fluxen in Anwesenheit von Xanthinoxidase-generierten O_2^- Radikalen.....	39
3.9.	Compound-II-Bildung bei physiologischen H_2O_2 -Fluxen in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Additive.....	41

3.10.	Bestimmung der Ferrikatalase u. Compound-II-Entwicklung bei Inkubation von Katalase mit physiologischen H_2O_2 -Fluxen in An- bzw. Abwesenheit von Additiven.....	43
3.11.	Bestimmung des bevorzugten Reaktionszyklus von Katalase bei verschiedenen H_2O_2 -Fluxen und physiologischen NADPH-Konzentrationen	46
3.12.	NADPH-Verbrauch bei niedrigen und hohem $v(H_2O_2)/[Katalase]$ -Verhältnissen.....	50
3.13.	Beeinflussung des Katalasezyklus-Anteiles am Gesamtreaktionszyklus durch Zugabe unterschiedlicher Additive (Methanol, NADPH) in unterschiedlichen Konzentrationen.....	52
3.14.	Stabilität der Katalase gegenüber oxidativen Angriffen. Peroxinitrit als Modellinitiator.....	53
4.	Diskussion.....	56
4.1.	Unterschiedliche Reaktionsmöglichkeiten des Enzyms bei unterschiedlichen $v(H_2O_2)/[Katalase]$ -Verhältnissen	56
4.2.	Verhalten von Katalase unter physiologischen Bedingungen bzw. <i>in vivo</i> ..	56
4.3.	Reaktion von Katalase bei niedrigen H_2O_2 -Fluxen und Stabilität gegenüber oxidativen Angriffen	60
5.	Zusammenfassung.....	62
6.	Material und Methoden.....	64
6.1.	Charakterisierung der eingesetzten Katalase, Peroxidase, Glucoseoxidase und Xanthinoxidase.....	64
6.2.	Herstellung des verwendeten Puffers und Entfernung von Metallionen.....	65
6.3.	Lösen von Rinderleberkatalase für anschließende Aufbereitung.....	66
6.4.	Aufreinigung von Rinderleberkatalase mittels Gelfiltrationssäule.....	66
6.5.	Aufreinigung von Katalaselösung mittels 100 kDa „Microcons“.....	68
6.6.	Dialyse von Rinderleberkatalase.....	69

Inhaltsverzeichnis

6.7.	Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in Lösungen mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode.....	70
6.8.	Bestimmung der H ₂ O ₂ -Konzentration mittels Amplex-Red.....	72
6.9.	Fluorimetrische Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz.....	74
6.10.	Bestimmung der Katalase-Aktivität mittels UV/VIS-Spektroskopie.....	74
7.	Literaturverzeichnis.....	77
8.	Anhang.....	84
8.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	84
8.2.	Konstanten.....	85
8.3.	Extinktionskoeffizienten der eingesetzten Substanzen.....	86
8.4.	Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte.....	86
8.5.	Literaturliste beteiligter Veröffentlichungen	87
9.	Curriculum vitae.....	88

1. Einleitung

1.1. Katalase

Neben schädlichen exogenen Einflüssen (wie etwa chemische (aus dem umgebenden Milieu); bzw. physikalische (z.B. kosmische Strahlung)) sind es vor allem zellinterne, beim Abbau bzw. beim Umbau entstehende Substanzen, wie Wasserstoffperoxid sowie verschiedene Radikale (z.B. ROS-Radikale), womit Zellen konfrontiert werden. Um diese Noxen zu neutralisieren bzw. zu eliminieren, bedienen sich Zellen verschiedener Strategien. Zum einen werden niedermolekulare Verbindungen als Radikalfänger (z.B. Vitamin E, β -Karotin, Ascorbinsäure, Coenzyme, Glutathion u.a.) eingesetzt, oder es erfolgt ein enzymatischer Abbau mittels Katalase, Superoxiddismutase, Peroxidoxine, Peroxidase u.a. Enzymen. In diesem Zusammenhang ist vor allem das weit verbreitete Enzym Katalase zu erwähnen, welches der Zelle bzw. dem Gewebe zum Abbau von toxischem Wasserstoffperoxid dient. Hierbei wird folgende Reaktion katalysiert:



Wasserstoffperoxid, ein Zwischenprodukt des Stoffwechsels, welches unvermeidlicherweise bei der aeroben Lebensweise entsteht, wird z.B. in den Erythrozyten, Hepatozyten, Mitochondrien und anderen Zellen bzw. Zellorganellen produziert. Die Bildung dieses Moleküls kann bei verschiedenen biochemischen Reaktionen erfolgen. Meist wird das Molekül aus dem Superoxidradikalanion $\text{O}_2^{\cdot -}$ gebildet, welches enzymatisch (z.B. mittels Superoxid-Dismutase) zum weniger schädlichen H_2O_2 abgebaut wird. So kann H_2O_2 beispielsweise während der Dehydrogenierung von Acetyl-CoA durch die Acetyl-CoA-Oxidase produziert werden. Andere peroxisomale H_2O_2 -produzierende Enzyme sind beispielsweise Uricase und D-Aminosäureoxidase. Wasserstoffperoxid kann neben seiner zellschädigenden Wirkung (z.B. Oxidation von Enzymen wie etwa der Seduheptulose-bisphosphatase bzw. der Fructose-bisphosphatase von Chloroplasten ^[1]) auch eine physiologische Signaltransduktionswirkung ausführen. Hierzu werden z.B. bei Pflanzen Wasserstoffperoxid-Gradienten über Membranen aufgebaut, welche dann regulativ in Prozesse der Signaltransduktion oder der Apoptose eingreifen können ^[2]. Eine physiologisch wichtige Funktion erfüllt H_2O_2 in der Schilddrüse, wo

Einleitung

es für die Oxidation von Jodid zu Jod eingesetzt wird (das Jodid wird in den Schilddrüsenepithelien mittels einer Peroxidase zu Jod oxidiert, wobei H_2O_2 zu Wasser umgewandelt wird). Die Beobachtung, dass Wasserstoffperoxid von Geweben abgebaut werden kann, wurde schon zu Beginn des 19. Jahrhunderts von Thénard (1818) gemacht. Allerdings war es Loew, der im Jahre 1901 erstmalig die wasserstoffperoxid-zersetzende Wirkung einem Enzym zusprach (1863 vermutete Schönbein noch irrtümlich, dass es eine allgemeine Eigenschaft von Geweben wäre, Wasserstoffperoxid abzubauen). Eine mögliche Hemmung von Katalase entdeckte Warburg 1923 durch Reaktion mit Cyanid und schlussfolgerte daraus richtig, dass das Enzym Eisen enthalten muss und dass das Eisenatom ein wichtiger Bestandteil des Holoenzym sei. Aber erst Zeile und Hellström erkannten 1930 den Hämatincharakter von Katalasen und somit die Bedeutung des Eisenatoms als zentralem Bestandteil der prosthetischen Gruppe, zu einem Zeitpunkt, als bereits länger das Vorhandensein von Eisenatomen in Zellen bekannt war (dies lieferte letztendlich den Beweis für die bereits 1927 vermutete Proteinnatur) ^[3,4]. Erstmalig im Jahre 1937 gelang es Sumner und Dounce, Katalase aus Rinderlebern zu kristallisieren ^[5]. Katalasen und auch Peroxidasen übertragen Wasserstoff auf H_2O_2 , wobei Wasser gebildet wird. Im Falle der Katalase stammt der Wasserstoff aus einem zweiten H_2O_2 -Molekül (Dismutationsreaktion; H_2O_2 stellt gleichzeitig Wasserstoffdonator und Wasserstoffakzeptor dar). Dagegen stammt der Wasserstoff bei der Peroxidasereaktion aus einem geeigneten Substrat, z.B. aus einem Alkohol oder Diphenol, das durch Wasserstoffentzug oxidiert wird. Katalase findet sich in nahezu allen aerobisch lebenden Organismen; sowohl bei pro- wie auch eukaryontischen Einzellern sowie bei Tieren und natürlich auch beim Mensch. Es verwundert nicht, dass bis zum heutigen Tage Katalasen von Bakterien ^[6], Hefen bzw. Pilzen ^[7], Algen, tierischen Organismen ^[8,9] und Pflanzen ^[1] beschrieben, klassifiziert, näher untersucht und größtenteils auch sequenziert worden sind. Katalasen werden grundsätzlich in drei Klassen eingeteilt, wobei sich die Einteilungen auf funktionelle Unterschiede stützen:

Klasse-I Katalasen

Monofunktionale Katalasen, welche Hämgruppen besitzen. Es können noch weitere Unterteilungen in Untergruppen erfolgen (je nach Größe der an der Bildung des Holoenzym beteiligten Untereinheiten). Zur Klasse-I Katalasen werden auch pflanzliche Katalasen gezählt (hierbei erfolgt aber eine weitere Klassifizierung ^[1]).

Klasse-II Katalasen

Katalasen, die in ihrer Struktur und Sequenz stark mit Peroxidasen höherer Pflanzen verwandt sind (sog. Kata-

lasen-Peroxidasen). Klasse-II Katalasen finden sich in Pilzen und prokaryontischen Zellen ^[10].

Klasse-III Katalasen

Nicht hämhaltige Katalasen, die im aktiven Zentrum statt eines Eisenatoms Mangan enthalten; zu finden z.B. bei Laktobakterien und thermophilen Bakterien.

Die Katalase-Konzentration ist in den jeweiligen Zellen bzw. Geweben stark schwankend. So finden sich bei Säugetieren besonders hohe Katalasekonzentrationen sowohl in den Leber- als auch in den Nierengeweben. Dagegen enthalten Bindegewebszellen nur relativ wenig Katalase. Sehr hohe Katalasekonzentrationen werden außerdem in Erythrozyten von Säugetieren gefunden (humane Erythrozyten: 2-3 μM ^[11]). Interessanterweise sind dagegen Erythrozyten von Enten nahezu völlig katalasefrei ^[12]. Die Konzentrationen und die Aktivitäten der Katalasen in verschiedenen Organen bzw. Geweben ein und desselben Organismus können stark variieren. Aber auch die Struktur der Katalase kann verschieden sein. So unterscheidet sich beispielsweise Rinderhepatozyten- von Rindererythrozytenkatalase um ein c-terminales Peptidstück in einer Länge von 11 Aminosäuren ^[13]. Bei den meisten Organismen besteht die vorgefundene Katalase aus einem Tetramer, welches sich aus vier gleichen Untereinheiten aufbaut. Das Molekulargewicht der einzelnen Untereinheiten beträgt, je nach Spezies, etwa 60 kDa ^[4]. Interessanterweise zeigen aber auch Organismen, die nicht zur Synthese einer Hämgruppe befähigt sind (z.B. *Lactobacillus plantarius*) Katalase-Aktivität. Bei dieser Spezies trägt die Katalase pro aktives Zentrum jeweils ein Manganatom statt eines Eisenatoms. Jedoch sind diese Katalasen nicht zur Bildung einer tetrameren Struktur befähigt. Hierbei besteht das Enzym aus sechs identischen Proteinuntereinheiten. Katalase zeichnet sich durch eine sehr hohe Temperaturstabilität aus, wobei erst Temperaturen höher als 80°C zu einem signifikanten Aktivitätsverlust führen. Hohe Temperaturen führen zu einer Veränderung der Sekundärstruktur und als Folge kommt es zu einer Dimerenbildung. Einige spezialisierte Organismen, wie etwa *Thermus thermophilus*, können wesentlich höhere Temperaturen tolerieren. Dieses in heißen Quellen lebende Bakterium kann seine Katalaseaktivität selbst dann noch vollständig aufrechterhalten, wenn der Organismus auf 90°C erhitzt wird ^[14,15]. Schon vor über 40 Jahren beobachteten Nicholls und Schonbaum ^[4] eine hohe Stabilität der Katalase gegenüber oxidativen Angriffen und vermuteten, dass dies durch die Bereitstellung von proteininternen Elektronen erfolgt, welche durch Oxidation von Aminosäuren (z.B. Tryptophan) freigesetzt werden. In diesem Zusammenhang wird immer wieder vom „endogenous donor“ gesprochen, wobei sich dies auf die oben genannte Fähigkeit des Enzyms bezieht. Dadurch ist

es der Katalase möglich, ihre Aktivität in einem großen Toleranzbereich aufrecht zu erhalten. Mit hoher Wahrscheinlichkeit stellt der „endogenous donor“ den Schlüssel für die hohe Resistenz gegenüber oxidativen Angriffen dar.

1.2. Funktion der Katalase

Die Hauptaufgabe der Katalase ist der Abbau von Wasserstoffperoxid, welcher in hohen Konzentrationen zytotoxisch wirkt. H_2O_2 wird durch Katalase in physiologische Substanzen wie Wasser und Sauerstoff (vgl. Gl. 1)) abgebaut. Der Abbau von Wasserstoffperoxid erfolgt in einem Mechanismus, welcher aus zwei Einzelreaktionen (Gl. 2 und Gl. 3) besteht ^[9,16]:



Die Reaktion startet ausgehend von der katalatisch aktiven, dreifach positiv geladenen Grundform, der Ferrikatalase $\text{Cat}(\text{Por-Fe}^{(3+)})$. In einer ersten Reaktion (Gl. 2) lagert sich ein Wasserstoffperoxidmolekül an das $\text{Por-Fe}^{(3+)}$ -Atom der Hämgruppe an. Hierbei erfolgt eine Oxidation des Eisenatoms hin zum $\text{Por-Fe}^{(4+)}$. Bei der Reaktion wird ein Molekül Wasser freigesetzt. Die sich bildende Spezies besitzt ein Oxoferryl-Zentrum mit einem Porphyrin-Radikal-Kation (Compound-I ^[17,18,19]). Das gebildete Compound-I-Kation reagiert weiter, und es erfolgt eine weitere Reaktion (Gl. 3) mit einem zweiten Wasserstoffperoxidmolekül. Bei dieser Reaktion wird Compound-I unter Freisetzung von einem Molekül Sauerstoff und einem weiteren Molekül Wasser wieder zur Ausgangsform (Ferrikatalase) reduziert.

Anschließend kann die Ferrikatalase erneut mit Wasserstoffperoxid reagieren, und der Zyklus kann erneut starten. Alternativ kann das Enzym (ausgehend von Compound-I) noch weitere Reaktionen durchführen (vgl. Abb. 1), wobei diese maßgeblich von der vorliegenden H_2O_2 steady-state-Konzentration abhängig sind ^[20,21,22].

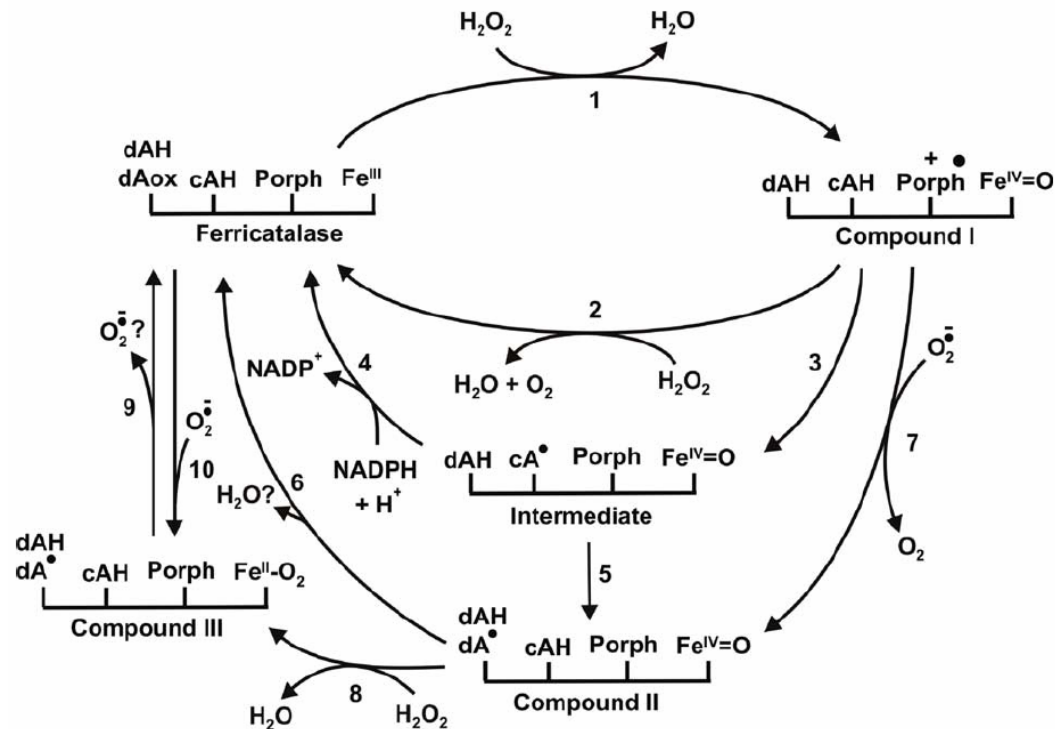


Abb. 1: Möglicher Katalase-Zyklus (modifiziert H. de Groot ^[23])

Die Reduktion von Compound-I bei niedrigen (physiologischen) Wasserstoffperoxidfluxen kann mit Hilfe eines weiteren Wasserstoffdonators (AH_2) erfolgen (Gl. 4 der Abb. 1) ^[3,4]. Als mögliche Wasserstoffdonatoren können meist kurzkettige Alkohole, Carbonsäuren bzw. Peroxycarbonsäuren fungieren ^[5], wobei die Katalase dann wie eine (Zwei-Elektronen) Peroxidase arbeitet (sog. Peroxidase-Zyklus). Der Donor (AH_2) wird hierbei oxidiert und Compound-I zur Ferrikatalase reduziert. Physiologischer relevant ist beispielsweise die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd durch Compound-I z.B. in der Leber von Rindern ^[24,25]. Die Umwandlung von Compound-I in ein sog. Intermediat (vgl. Abb. 1 Reaktion 3) wurde von Hiller und Nicholls postuliert, konnte aber bis jetzt nicht eindeutig gezeigt werden ^[26]. Neben der katalytisch aktiven Ferrikatalase bzw. dem Compound-I Radikal-Kation, können noch zwei weitere Katalasespezies gebildet werden, die als Compound-II ^[19,27,28] und als Compound-III ^[29,30] bezeichnet werden, wobei Compound-II/III nicht mehr zur Spaltung von H_2O_2 und Bildung von O_2 befähigt sind (vgl. Abb. 1). Compound-II kann durch Reaktion mit H_2O_2 in Compound-III umwandelt werden (vgl. Abb. 1 Reaktion 8). Die Bildung von Compound-II kann durch die Reaktion von Compound-I mit Ein-Elektronen-Donatoren (z.B. Ascorbinsäuremolekülen) erfolgen. Superoxid-Radikalanionen ihrerseits können auch zur Bildung von Compound-II führen, wenn diese mit Compound-I reagieren (vgl. Reaktion 7 Abb. 1), wobei das Intermediat mit einem $O_2^{\cdot-}$ -Teilchen unter Bildung von Compound-II gebildet wird ^[31]. Es

Einleitung

scheint möglich, dass Compound-III auch durch Aufnahme eines $O_2^{\cdot-}$ -Teilchen durch Ferrikatalase gebildet werden kann (vgl. Abb. 1 Reaktion 10). Bei der anschließenden Reduktion zu Ferrikatalase wird wahrscheinlich das aufgenommene $O_2^{\cdot-}$ -Teilchen wieder freigesetzt; vgl. Reaktion 9 Abb. 1. Sowohl Compound-II als auch Compound-III sind in der Lage, durch Bereitstellen von proteininternen Aminosäuren („endogenous donor“) das oxidierte Eisenatom des Häms zu reduzieren und sich somit zur Ferrikatalase umzuwandeln ($t_{1/2}$ Compound-II: 20 min bzw. Compound-III: 5 min^[32]). Bei der Reduktion von Compound-II wird dabei höchstwahrscheinlich das Sauerstoffatom mit einem Wasserstoffatom reagieren und als Produkt wird Wasser freigesetzt (vgl. Reaktion 6 Abb. 1 ($\text{Protein}^{n+}(\text{Compound-II}) \rightarrow \text{Protein}^{(n+1)+}(\text{Ferrikatalase}) + H_2O$). Die spontane Umwandlung von Compound-II zu Ferrikatalase (vgl. Reaktion 6 Abb. 1) kann mittels UV/VIS-Spektroskopie verfolgt werden (langsame Verschiebung der Soret-Bande von 435 nm hin zu 405 nm). Eine Inaktivierung des Enzyms durch Compound-II/-III Bildung wird in Gegenwart niedriger Wasserstoffperoxid Konzentrationen durch NADPH (vgl. Reaktion 4 Abb. 1) bzw. Ethanol verhindert^[33].

1.3. Struktur des Enzyms

Bei Säugetier-Katalasen handelt es sich um globuläre Enzyme, die aus vier gleichartigen Untereinheiten bestehen. Jede Untereinheit wird aus einer Polypeptidkette^[34] gebildet. Mittlerweile liegen die Sequenzen verschiedener Katalasen vor (die Aminosäuresequenz von Rinderleberkatalase liegt komplett vor^[13]). Jede Untereinheit der Rinderleberkatalase besteht aus insgesamt 506 Aminosäuren, von denen aber ein geringer Prozentsatz der Katalaseuntereinheiten am c-Terminus noch ein kurzes, etwa 15 Aminosäuren langes Peptidstück^[24] enthält. Die Sekundärstruktur besteht aus mehreren α -Helices sowie einem achtsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt. Der Helixanteil wurde mit Hilfe verschiedener Verfahren ermittelt und beträgt nach dem optischen Rotationsdispersions (ORD)-Verfahren 50 %; wogegen mittels Röntgenstrukturanalyse ein Wert von 26 % gemessen wurde^[24]. Durch neuere Messungen mit Hilfe der Circular-Dichroismus-Methode wurde ein Helixanteil von 41 % ermittelt^[35]. Die Tertiärstruktur gliedert sich in vier Bereiche: Der erste Bereich, welcher aus zwei Helices aufgebaut ist, stellt einen Arm dar, der aus dem Proteinknäuel herausragt. In einem zweiten Bereich, der auf der Hämrückseite liegt, befindet sich die Faltblattstruktur. Der dritte Bereich bildet die Außenschicht, über die der Hauptkontakt zu den anderen Untereinheiten gebildet wird. Über

einem vierten Bereich wird ein Zugang zum katalytisch aktiven Zentrum hergestellt. Die Ausbildung der Quartärstruktur erfolgt durch die Zusammenlagerung der vier Untereinheiten zu einer Tetramerstruktur. Für den Zusammenhalt ist vor allem der Arm des ersten Bereiches einer jeden Untereinheit von wichtiger Funktion. Aber auch die Wechselwirkungen der Außenschichten (des zweiten Bereiches) spielen hierbei eine zentrale Rolle für den Zusammenhalt. Interessanterweise sind für den Zusammenhalt keinerlei kovalente Bindungen und auch keine Disulfidbrücken (R-S-S-R) von Wichtigkeit, obwohl die Katalase insgesamt über 16 Cysteinreste (vier Cysteinreste pro Untereinheit) verfügt. In der Aufsicht zeigt das Enzym eine 222 Symmetrie, die im Aussehen einer Hantel ähnelt. Die Molekülmaße belaufen sich auf $90 \times 60 \times 80 \text{ \AA}$; die Hämgruppe liegt etwa 30 \AA ^[36] von der Proteinoberfläche und rund 23 \AA vom Molekülzentrum entfernt. An Hand von Fluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass das Enzym überwiegend hydrophile Strukturen enthält ^[37,38]. Aber nicht nur die Proteinoberfläche, sondern auch die hantelförmigen Bereiche, die die Zugänge zu dem reaktiven Zentrum der Untereinheit beinhalten, zeigen einen fast ausschließlich hydrophilen Charakter. Die stark hydrophile Proteinoberfläche wird jedoch von einem Bereich aus einem hydrophoben Band quer überzogen. Die Größen bzw. Gewichte vieler verschiedener Katalasen erstrecken sich in einem engen, begrenzten Bereich und scheinen stark konserviert zu sein. Tetramere Rinderleberkatalase weist ein Molekulargewicht von 250 kDa auf ^[39]. Jedoch sind für Rinderleberkatalase bisweilen recht unterschiedliche Molekulargewichte ermittelt worden. Rein rechnerisch ergibt sich aus der Aminosäuresequenz ein Molekulargewicht von 232,400 kDa (58,1 kDa pro Untereinheit). Untersuchungen mittels Viskositäts- und Sedimentationsmessung ergaben ein Molekulargewicht zwischen 220 kDa und 270 kDa ^[40]. Meist wird ein Molekulargewicht mit 240 kDa von den Herstellerfirmen angegeben ^[41]. Daher wurde auch dieses Gewicht allen Berechnungen dieser Arbeit zugrunde gelegt. Bei Rinderleberkatalase liegt der ermittelte, isoelektrische Punkt bei einem pH-Wert von $\text{pH}=5,8$ ^[4]. Pro Untereinheit wird jeweils ein Molekül NADPH gebunden ^[42]. Aufgrund der Größe des NADPH-Moleküls kann dieses jedoch nicht direkt zum aktiven Zentrum gelangen, sondern die Bindungsstelle liegt an der Proteinoberfläche, die sich in einem Abstand von 20 \AA vom aktiven Zentrum entfernt befindet. Das gebundene NADPH-Molekül steht an der Bindungsstelle mit jeweils einem Lysin- und einem Argininrest in Verbindung. Neben den vier gebundenen NADPH Molekülen, enthält das Katalaseenzym weiterhin noch eine große Anzahl an Wasser-Molekülen. Immerhin wurden pro Enzymmolekül insgesamt 49 gebundene Wassermoleküle vorgefunden ^[43,44]. Der Hämgruppe einer jeden Untereinheit liegt als zentrales Grundgerüst ein Porphyrinring zugrunde. Das Porphyrin ($\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_4$), welches chemisch zu der Gruppe der Naturfarbstof-

Einleitung

fe gehört, findet sich außer bei Katalase noch in vielen weiteren biochemisch relevanten Molekülen (z.B. Hämoglobin, Chlorophyll etc.), wo es zentrale Funktionen im Molekül ausübt. Porphyrine bestehen im Allgemeinen aus einem 16-gliedrigen, mesomeriestabilisierten Ringsystem, in dem vier Pyrrolringe durch vier Methinbrücken (-CH=) verbunden sind ^[45]. Die tiefe, intensive Farbe des Porphyrins entsteht durch fortlaufende Konjugationen der Doppelbindungen im Ringsystem (Mesomeriestabilisierung; vgl. Abb. 2).

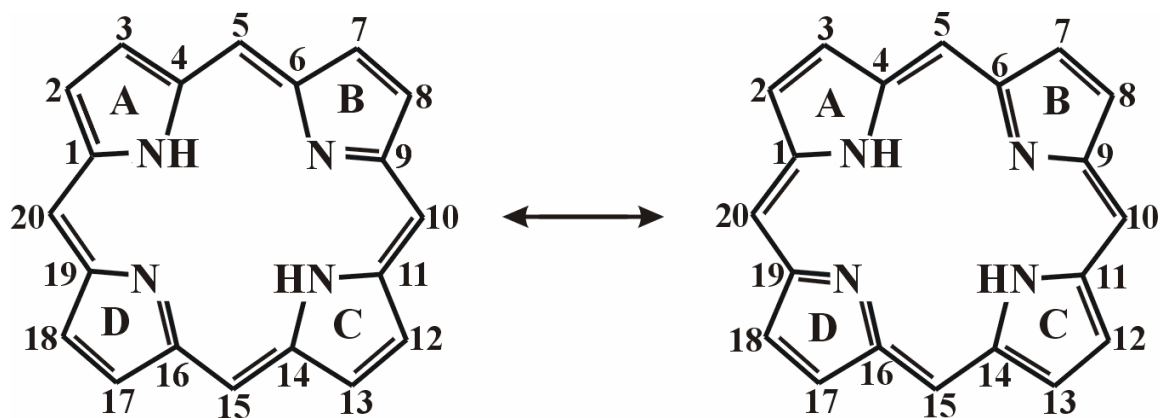


Abb. 2: Mesomeriestabilisierung des Porphyrinringes

Die Biosynthese des Porphyrinringes erfolgt bei Säugern aus der Aminosäure Glycin und dem Succinyl-Coenzym A, was David Shemin 1945 ^[46] erstmalig durch Isotopenmarkierungsversuche mit ¹⁵N-Glycin zeigen konnte. Das im Protoporphyrin IX gebundene Por-Fe⁽³⁺⁾-Atom befindet sich in einem high-spin Zustand ^[24,47,48]. Der Einbau des Eisens erfolgt bei Säugern durch die Ferrochelatase (für den Eisentransport im Plasma ist das Transferrin verantwortlich). Häm-Gruppen sind allgemein sehr leicht oxidativ angreifbar (schon in der Gegenwart einer schwachen Säure erfolgt die Abspaltung des Eisens ^[49]; auch *in vivo* kann das Eisenatom relativ einfach abgespalten werden). Hierbei setzt eine oxidative Spaltung zwischen dem A- und B-Ring des Moleküls an; es bildet sich Biliverdin, und das Eisenatom wird freigesetzt:

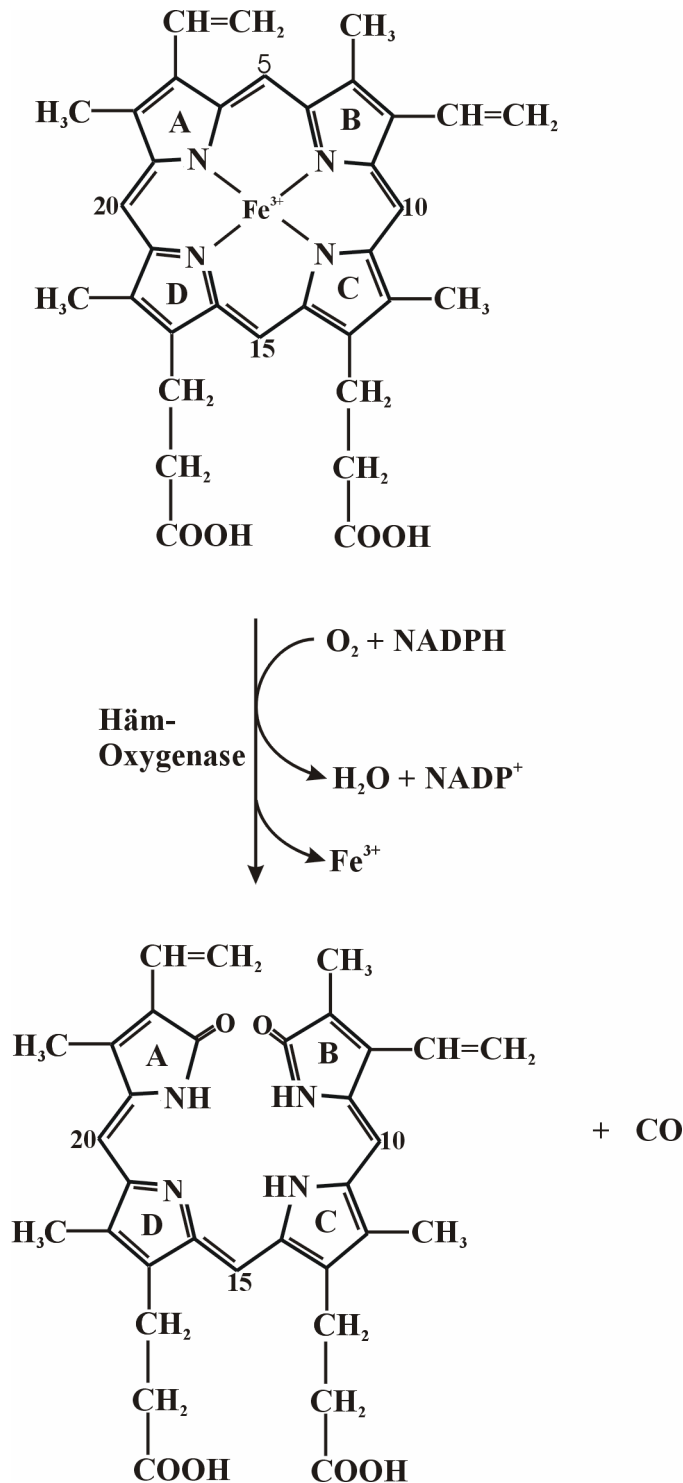


Abb. 3: Oxidativer Abbau von Hämatin zu Biliverdin

Als Katalysator bei dieser Reaktion dient die Häm-Oxygenase. Für die Spaltung wird jeweils O_2 und NADPH benötigt. Biliverdinkomplexe sind katalytisch inaktiv ^[38]. Das Eisenatom besitzt insgesamt 6 Koordinationsstellen, wobei die 6. Koordinationsstelle unbesetzt vorliegt. Die Bindung des Wasserstoffperoxid-Moleküls erfolgt über Wasserstoffbrücken, woran die Aminosäuren Histidin (His-74) sowie Asparagin (Asn-147) beteiligt sind.

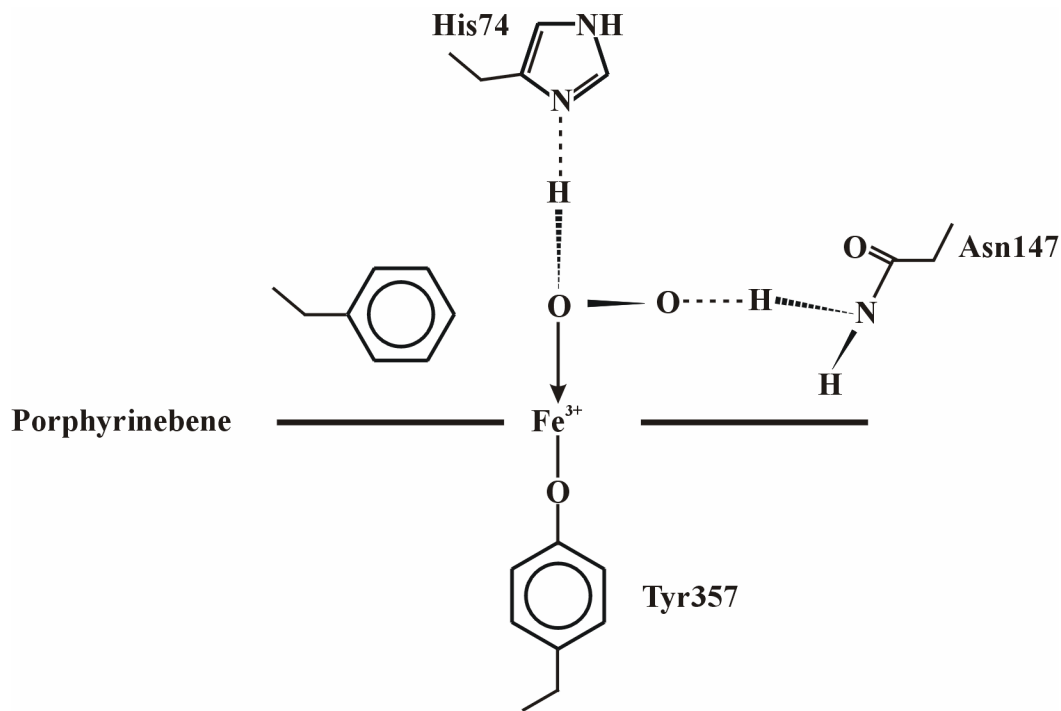


Abb. 4: Anlagerung von H_2O_2 an das aktive Zentrum der Katalase

Durch Strukturvergleich der Katalasen von *Penicillium vitale* ^[50,51], Rinderleber ^[52,53,54] und *Micrococcus lysodeiticus* ^[52] zeigte sich, dass die Position und Orientierung des Häms im Protein konserviert vorliegt. Zu erreichen ist das aktive Zentrum über einen langen, hydrophoben Kanal (Major-Channel; vgl. Abb. 5), der an der Moleküloberfläche mit hydrophilen Aminosäuren umrandet ist und eine Öffnung von ca. 15 Å ausbildet. Die Länge des Major-Channels beträgt etwa 30 Å. An der engsten Stelle beträgt der Durchmesser dieses Kanals nur 3,5 Å, was für die Orientierung des Substrates von enormer Wichtigkeit ist ^[44]. NADPH-abhängige Katalasen, wie etwa Rinderleberkatalase, besitzen neben dem Major-Channel noch zwei weitere Proteinkanäle (Channel-I und II).

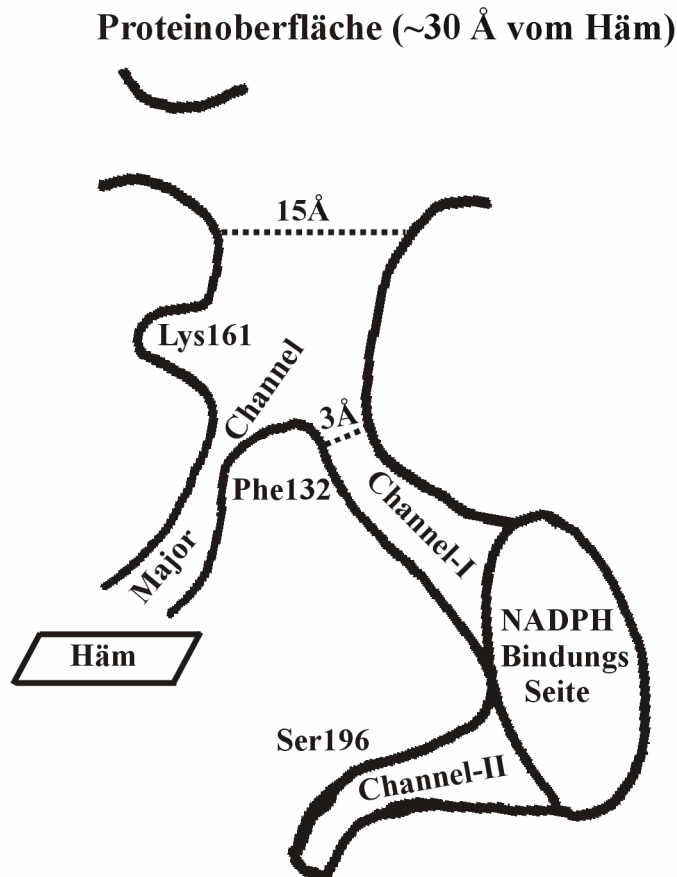


Abb. 5: Schematische Abbildung des aktiven Zentrums von Katalase

Beide Kanäle starten an der NADPH-Bindungsstelle, wobei der erste Kanal (Channel-I; vgl. Abb. 5) den Major-Channel in einer Entfernung von etwa 13 Å (vom Häm entfernt) an der distalen Seite erreicht. Aber auch über den zweiten Nebkanal (Channel-II) kann das Häm erreicht werden. Channel-II ist bei vielen Katalasen vorhanden und führt über das dicht am aktiven Zentrum liegende Serin-196 (*Proteus mirabilis*) zur Hämgruppe [16,53,54,55]. Die Umsatzraten für den Einlass von Wasserstoffperoxid sowie den Ausstoß von Wasser und Sauerstoff durch den Kanal sind recht beeindruckend: So werden Umsatzraten zwischen 2 und 10 Millionen Wasserstoffperoxidmoleküle pro Sekunde bei Säugetierkatalasen erreicht [16]. Die Rolle, welche den beiden Nebkanälen für den Ausstoß der Produkte zukommt, konnte bislang noch nicht eindeutig geklärt werden [55,56]. Durch den Aufbau bzw. die Lokalisation des Häms wird verständlich, dass die Reaktion von großen Molekülen am aktiven Zentrum sterisch gehindert ist, und dadurch die Oxidationsreaktion von kleinen Molekülen an der Hämgruppe bevorzugt wird. Größere Moleküle, wie etwa Ascorbinsäure, sollen den Vorstellungen nach an der Proteinoberfläche oxidiert werden (Oxidation wahrscheinlich in der NADPH-Bindungstasche); die hierdurch freiwerdenden Elektronen werden anschließend zum

aktiven Zentrum geleitet. Beim Betrachten der Hämgruppe zeigt diese einen nahezu planaren Aufbau. Lediglich das Eisenatom liegt etwas außerhalb der Molekülebene. Das Eisenatom des Häms zeigt eine fünffache Koordination, wobei die sechste Koordinationsstelle unbesetzt bleibt. Wichtig für die Aufrechterhaltung der hohen Oxidationsstufe des Eisens ist der fünfte Ligand (Tyrosinrest 357), welcher deprotoniert vorliegt. Die Aminosäuren Histidin 74 und Asparagin 147 können aufgrund der räumlichen Distanz hierbei nicht als Ligand dienen, befinden sich jedoch nahe genug, um die Substrate zu dirigieren ^[43,44].

Peroxisome besitzen keine eigene DNA ^[57]. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, dass Peroxisome auf den Import von Proteinen und Enzymen angewiesen sind. Für den Import erhalten die im Cytosol der Zellen synthetisierten Proteine so genannte Targeting-Sequenzen, welche dem spezifischen Import in das jeweilige Organell dienen. Der mitochondriale Import erfolgt über N-terminale Sequenzabschnitte, die häufig während oder nach dem Import durch die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase abgespalten werden ^[58]. Dagegen erfolgt der peroxisomale Import meist über die c-terminale peroxisomale Targeting-Sequenz 1 (PTS-1; Ser-Lys-Leu, seltener Cys-Ala-Ser-Pro/Lys-Arg/Leu-Met) oder über die N-terminale Targeting-Sequenz 2 (PTS-2; Arg-Lys/Leu-Val-Ile/X₅-His-Gln/Leu-Ala). Auch pflanzliche Katalasen werden im Cytosol synthetisiert und müssen posttranslational in die Peroxisomen importiert werden. Für den Import in das Zellorganell enthalten Katalasen jedoch weder die oben genannte PTS-1 noch die PTS-2 Sequenz. Für die Katalase A von *Saccharomyces cerevisiae* konnten insgesamt zwei peroxisomale Targeting-Sequenzen, eine C-terminale (Ser-Ser-Asn-Ser-Lys-Phe) und eine interne Sequenz identifiziert werden ^[59]. Die Targeting-Sequenz scheint bei Säugern konserviert zu sein; so konnte Trelease et al. 1996 ^[60] die C-terminale, peroxisomale Import-Sequenz von Rattenleberkatalase (Ala-Asn-Leu) identifizieren, die sich fast mit der Import-Sequenz humaner Katalase (Lys-Ala-Arg-Leu) deckt ^[61]. Die Targeting-Sequenzen scheinen nicht hochspezifisch für den peroxisomalen Import zu sein. So kann beispielsweise Katalase A von oxidativ gestressten Hefezellen mittels der peroxisomalen Targeting-Sequenz auch in Mitochondrien importiert werden ^[62]. Für die Funktion der Katalase spielt die korrekte Tetramerisierung eine entscheidende Rolle ^[63]. Es ist davon auszugehen, dass das Tetramer im Cytosol assembliert, aber direkt vor dem Import wieder entfaltet wird, um anschließend im Peroxisom wieder zu reassemblieren.

1.4. Bedeutung der Katalase für die Zelle sowie technische Anwendung

Rein biochemisch betrachtet stellt Katalase eine spezialisierte Peroxidase dar. So schützt das Enzym beispielsweise Hämoglobin und SH-haltige Proteine in den Erythrozyten vor oxidativen Veränderungen. Eine geringe Katalaseaktivität in den Erythrozyten führt bei Anwesenheit von Oxidanzien (wie etwa oxidierende Radikale) oder durch ultraviolette Strahlung zur Methämoglobinbildung (als Folge kann das Eisen-Atom des aktiven Zentrums im Methämoglobin (Por-Fe⁽³⁺⁾) keinen Sauerstoff mehr transportieren). Zur Entfernung von reaktiven Superoxidradikalanionen aus Zellen und Zellkompartimenten (wie z.B. Peroxisome, Erythrozyten etc.), enthält die Zelle das Enzym Superoxiddismutase, welches die Radikale dann in molekularen Sauerstoff und H₂O₂ umwandelt. Das H₂O₂ kann anschließend durch Katalase bzw. Peroxidase (z.B. mittels Glutathionperoxidase) abgebaut werden. Durch seine Aktivität schützt Katalase Gewebe vor der Bildung von cancerogenen Veränderungen, was E.J. Calabrese in den achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts zeigte ^[64]. Bei Patienten, die an dem Down-Syndrom (Trisomie-21) leiden, ist die Katalasekonzentration in den Erythrozyten in Relation zu gesunden Probanden um etwa 50 % erhöht. Hierbei scheint es sich um eine Anpassung der Erythrozyten an diese Krankheit zu handeln, da bei den Erkrankten eine etwa 50 – 60 % erhöhte Superoxiddismutase Aktivität zu beobachten ist (das verantwortliche Gen für das Enzym liegt auf dem Chromosom 21) ^[64]. Der H₂O₂-Haushalt scheint bei höheren Lebewesen (und auch beim Menschen) durch andere Mechanismen abgesichert zu sein. So besitzen beispielsweise Menschen, welche an *Acetalasemia* erkrankt sind, weniger als 10 % der normalen Katalasekonzentration. Patienten mit dieser rezessiv-vererbten, in Japan auftretenden Erkrankung, zeigen außer einer erhöhten Anfälligkeit für Geschwüre und Infektionen im Rachenraum keine weiteren pathologischen Veränderungen ^[4,24]. Das gleiche gilt auch für die in der Schweiz auftretende Form der *Acetalasemia*, bei der zwar die Katalasekonzentration normal ist, aber die Aktivität aufgrund der Stabilität des Enzyms stark eingeschränkt ist (Grund hierfür ist eine Dissoziation des Enzyms in Untereinheiten) ^[4,24].

Die technischen Verwendungsmöglichkeiten des Enzyms sind recht zahlreich. Beispielsweise wird die Oxidationswirkung von Katalase für Tests und Nachweisreaktionen genutzt, wobei häufig die Katalasefunktion mit anderen Enzymen gekoppelt wird. Bekannte Beispiele sind etwa Nachweisverfahren für Harnsäure und Cholesterin. Katalase kann auch zur Detektion von Entzündungsherden dienen, da bei einer Entzündung die H₂O₂-Konzentration sprunghaft ansteigt und lokal Spitzenkonzentrationen von bis etwa 10 µM erreicht werden können. So

Einleitung

deutet beispielsweise Katalaseaktivität in Milch auf mögliche Eutererkrankungen oder bakterielle Infektionen hin ^[65].

Biotechnologisch wird Katalase auch als Katalysator bei der Umwandlung von Glucose in Fructose eingesetzt. Beim sog. Cetus-Prozess wird Glucose mit Pyranose-2-Oxidase selektiv oxidiert und anschließend katalytisch zu Fructose hydriert. Bei der enzymatischen Oxidation wird H_2O_2 gebildet, welches anschließend durch zugefügte Katalase abgebaut wird. Neben der kostengünstigen Produktion weist die gewonnene Fructose einen Reinheitsgrad von 96 % auf ^[66]. Katalase wird ebenfalls in der Lebensmittelindustrie eingesetzt, um unerwünschtes Wasserstoffperoxid abzubauen, da der Einsatz nicht gesundheitsschädlich ist. Beispielsweise wird H_2O_2 zur Sterilisierung von Milch bei der Käseherstellung und zur Reinigung von Kontaktlinsen eingesetzt. Überschüssiges H_2O_2 wird anschließend durch Zugabe von Katalase zersetzt. Auch die Textilindustrie macht sich Katalase zunutze. Hierbei werden unerwünschte, bei der Bleichung von Textilien eingesetzte Peroxide, durch das Enzym abgebaut (aufgrund ihrer Größe können diese Moleküle nicht bis zum aktiven Zentrum gelangen und werden, ähnlich wie etwa Dihydrorhodamin-123 (vgl. „Ergebnisse“), an der Proteinoberfläche oxidiert).

1.5. Bestimmungsmöglichkeiten der Katalaseaktivität

Für die Bestimmung der Katalaseaktivität sind unterschiedliche Methoden gebräuchlich, welche sich hauptsächlich nach der Art des zu untersuchenden Materials (z.B. wässrige Lösungen, Blut, Gewebe etc.) richten. Neben physikalischen und chemischen Bestimmungsmethoden werden verstärkt auch immunochemische Aktivitätsmessungen (mit Hilfe von katalasespezifischen Antikörpern) eingesetzt. Tab. 2 gibt einen groben Einblick über die gängigsten Bestimmungsmöglichkeiten.

Tab. 1: Möglichkeiten zur Bestimmung der Katalaseaktivität

Methode	Material	Literatur
1. Messung d. H₂O₂-Verbrauches		
1.1 Jodometrie	Gewebe, Blut	Bonnichsen 1947 ^[67]
1.2 Permanganometrie	Gewebe, Blut	Feinstein 1949 ^[68]
	Gewebe, Blut	Takahara 1960 ^[69]
2. UV-Spektrophotometrie (E_{240nm})		
	Gewebe	Bergmayer 1955 ^[70]
	Blut	Werner, Heider 1963 ^[71]
3. Photometrie (E_{405nm} bis E_{415nm})		
3.1 Titansulfat	Gewebe, Blut	Hübl, Bretschneider 1964 ^[72]
3.2 Titantrichlorid	Blut	Pilz, Johann 1965 ^[73]
3.3 Vanadinsäure	Gewebe	Warburg, Krippahl 1963 ^[74]
4. Fluorimetrie		
4.1 Scopoletin ^{x1}	wässr. Lsg.	Perschke, Broda 1961 ^[75]
4.2 Diacetyldichlorofluorescein ^{x2}		Keston, Brandt 1965 ^[76]
5. Messung der O₂-Produktion		
5.1 Polarographie	Mikroorganismen	Jacob 1964 ^[77]
5.2 Sauerstoffelektrode	Blut	Ogata 1964 ^[78]
	Blut	Rørth, Jensen 1967 ^[79]
6. Manometrie		
6.1 Van Slyke-Apparatur	Blut, Gewebe	Kirk 1963 ^[80]
6.2 Technik nach Gagnon	Blut, Gewebe	Gagnon 1959 ^[81]
7. Immunpräzipitation (anti-Katalase)		
	Blut, Gewebe	Higahsi 1961 ^[82]
		Ben-Yoseph, Shapira 1973 ^[83]
8. Messung der Wärmetönung		
	Blut	Landahl 1953 ^[84]

^{x1}: Abnahme der Fluoreszenz ^{x2}: Zunahme der Fluoreszenz

2. Fragestellung

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Reaktionsverhaltens von Katalase bei niedrigen bzw. hohen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen, wobei sich das Verhältnis aus dem H_2O_2 -Flux (in $\mu\text{M min}^{-1}$) dividiert durch die Katalase-Konzentration (in μM) errechnet. Anhand von Vorversuchen zeigte sich, dass das Enzym nur bei hohen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen nach dem seit langer Zeit bekannten sauerstofffreisetzenden Mechanismus reagiert (vgl. Gl. 1 und Gl. 2/Gl. 3). Hierdurch ergibt sich jedoch ein Problem für das *in vivo*-Verhalten des Enzyms, da hohe H_2O_2 -Fluxe in Erythrozyten, Hepatozyten u.a. Zellen unter physiologischen Bedingungen (die H_2O_2 -Fluxe im humanen Erythrocyten betragen etwa $33\text{-}250 \text{ nM} \times \text{s}^{-1}$ bei einer Katalasekonzentration von ca. $2\text{-}3 \mu\text{M}$ ^[11]) kaum vorkommen. Somit bleibt es zweifelhaft, ob die sauerstofffreisetzende Reaktion überhaupt die vorherrschende Reaktion des Enzyms *in vivo* darstellt. Daher galt es zunächst, den genauen Umschaltunkt zwischen der sauerstofffreisetzenden und der nicht-sauerstofffreisetzenden Katalasereaktion zu finden. Ein weiterer wichtiger Punkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung des Einflusses bzw. dem Zusammenspiel von physiologisch bedeutsamen Additiven auf den katalatischen Reaktionsmechanismus. Hierbei ist bekannt, dass Ein-Elektronen liefernde Additive, wie etwa Ascorbinsäure mit Compound-I unter Bildung von Compound-II reagieren, wodurch Katalase längere Zeit katalytisch inaktiviert vorliegt. Bei Betrachtung der Konzentrationen in den Zellen (besonders in Hepatozyten) fällt auf, dass der hohen Konzentration an Ascorbinsäure (bis etwa 8 mM) nur eine geringe Konzentrationen an NADPH (ca. $40 \mu\text{M}$) entgegensteht. Um Antworten auf diese Diskrepanz zu erhalten, wurden zunächst die scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}) für die Reaktion von Compound-I mit verschiedenen Additiven (Ascorbinsäure, NADPH etc.) mit Hilfe der UV-VIS-Spektroskopie bestimmt. Um Aussagen über das Ferrikatalase/Compound-II-Verhältnis bei unterschiedlichen H_2O_2 -Fluxen, Additiven und Additiv-Verhältnissen zueinander zu erhalten, wurden entsprechende Spektren angefertigt. Interessant ist auch die Verwendung von Dihydrorhodamin-123 als Ein-Elektronen lieferndes Additiv, da diese Substanz bei der Oxidation einen gut zu detektierenden Farbstoff liefert. Anhand der gebildeten Farbstoffmenge könnten so Rückschlüsse auf den jeweiligen Einfluss der unterschiedlichen Reaktionsmechanismen gewonnen werden. Weiterhin wurde die enorme Regenerationsfähigkeit des Enzyms, z.B. bei oxidativem Stress, geringen H_2O_2 -Fluxen etc. untersucht.

3. Ergebnisse

Alle durchgeführten Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt. Einzelne Spektren stehen repräsentativ für die jeweiligen Durchgänge. Als geeignetes Modell einer Säugetierkatalase diente bei allen Experimenten Rinderleberkatalase, da diese (wie auch humane Erythrozytenkatalase) NADPH-abhängig ist. Um unerwünschte Kontamination mit Metallionen zu verhindern, wurde bei allen Experimenten Diätylenträminopentaessigsäure (DTPA; 100 μM) eingesetzt.

3.1. Abhängigkeit der katalatischen Sauerstoffproduktion von der eingestellten H_2O_2 steady-state-Konzentrationen

Um einen Einblick über das Verhalten von Katalase bei niedrigen und hohen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen zu erlangen, wurden hierzu $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse zwischen 0,8 (wenig H_2O_2 pro Katalase) und 1000 (viel H_2O_2 pro Katalase) eingestellt (Verhältnis $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ Bestimmung siehe Fragestellung). Als H_2O_2 -Quelle diente Glucoseoxidase (Glucoseoxidaseaktivität: 4 $\mu\text{M min}^{-1}$; Katalasekonzentration variabel) sowie ein mit Glucose-angereicherter Phosphatpuffer als Substrat. Die Abbildungen 6 A bzw. 6 B zeigen zur Verdeutlichung des Versuchsaufbaues exemplarisch zwei Versuchsdurchgänge. Die Messung erfolgte potentiometrisch mittels einer Clark-Sauerstoffelektrode. Hierzu wurde zuerst die Reaktionskammer mit vortemperiertem Phosphatpuffer gefüllt. Nachdem sich am Detektor bzw. am Schreiber eine stabile Grundlinie (Sauerstoffkonzentration von etwa 213 $\mu\text{M O}_2$ (vgl. Abb. 26)) eingependelt hatte, wurde die entsprechende Menge an Glucoseoxidase zugefügt. Die Bestimmung der notwendigen GOD-Konzentration wurde in Vorversuchen ermittelt, wobei bei dem eingesetzten Präparat 0,4 nM GOD einem Sauerstoffverbrauch von 4 $\mu\text{M O}_2 \text{ min}^{-1}$ entsprach (gemittelter Wert; bei 37°C). Nun erfolgte eine Sauerstoffabnahme durch die Glucoseoxidase, wobei sich nach kurzer Zeit eine konstante O_2 -Verbrauchsgeschwindigkeit eingestellt hatte (~1 - 3 min; abhängig von der eingesetzten Glucoseoxidaseaktivität). Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe der entsprechenden Katalasekonzentration.

Sofort folgte ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration aufgrund der katalytischen Aktivität der Katalase. Der Anstieg sollte idealerweise Gl. 1 und Gl. 2 folgend genau der hal-

Ergebnisse

ben Sauerstoffmenge entsprechen, welche die Glucoseoxidase zuvor verbraucht hatte. Wie sich zeigte, lag der Sauerstoffanstieg jedoch etwas höher (vgl. Abb. 26). Grund hierfür ist, dass die 4°C kalte Stammlösung der Katalase einen höheren Sauerstoffgehalt besitzt als die 37°C warme Reaktionslösung und es hierdurch zu einem Eintrag von Sauerstoff kam. Nach dem Wendepunkt stellte sich erneut eine O₂-Verbrauchsgeschwindigkeit ein. Entsprechend diesen Schemata wurden alle oben genannten $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse untersucht. Alle Versuche wurden parallel auch mit NADPH (1 mM) durchgeführt.

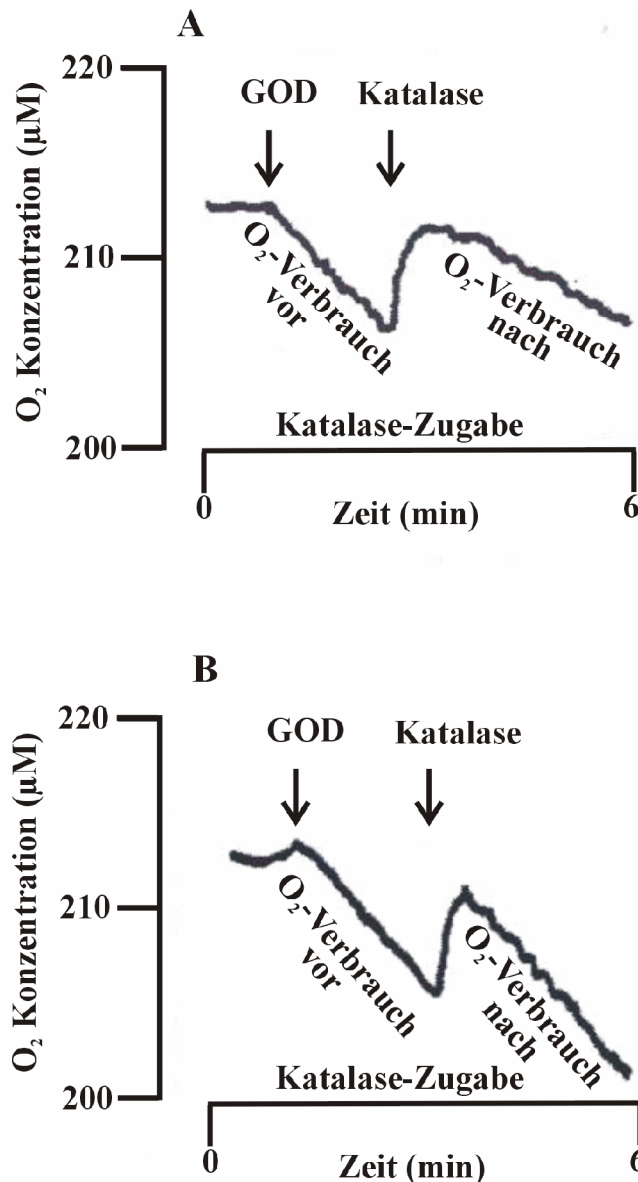


Abb. 6A/B: Einfluss der H₂O₂-Fluxe auf den Reaktionsmechanismus von Rinderleberkatalase ($\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis 2 (A) bzw. $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis 80 (B)). Durchgang A bzw. B repräsentiert jeweils ein einzelnes Experiment. K₂HPO₄-KH₂PO₄-Puffer (50 mM; pH= 7,0; 37°C); Katalasekonzentration: 0,05 μM (A) bzw. 2 μM (B); Aktivität (Glucoseoxidase): 4 μM H₂O₂ min⁻¹ (Glucoseoxidase-Konzentration: 0,4 nM); Glucose: 10 mM; DTPA: 100 μM.

Ergebnisse

Wie sich zeigte, ist der Sauerstoffverbrauch (nach Katalasezugabe; zweiter Pfeil) bei den beiden unterschiedlichen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen in Abb. 6 A/B nicht konstant, und es zeigte sich trotz ähnlicher Versuchsdurchführung (gleiche Glucoseoxidaseaktivität, aber unterschiedliche Katalasekonzentrationen) eine jeweilig anderer Sauerstoffverbrauch nach der Katalasezugabe. Bei der geringeren Katalasezugabe ($0,05 \mu\text{M}$) in Abb. 6A sank der Sauerstoffverbrauch auf etwa 50 %. Nachdem die Katalasekonzentration auf $2 \mu\text{M}$ erhöht wurde (gleiche Glucoseoxidaseaktivität), konnte nahezu kein Unterschied bezüglich des Sauerstoffverbrauches nach Katalasezugabe mehr festgestellt werden (vgl. Abb. 6B). Nachdem die Versuchsreihe für die $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse zwischen 0,8 und 1000 abgeschlossen waren, konnten die prozentualen Sauerstoffverbräuche in Abhängigkeit vom $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis in Abb. 7 zusammengefasst werden (die in Abb. 7 angegebenen prozentualen O_2 -Verbräuche errechnen sich durch Division der Sauerstoffaufnahme nach Katalase-Zugabe geteilt durch den Sauerstoffverbrauch vor Katalase-Zugabe (vgl. hierzu auch Abb. 6A/B)).

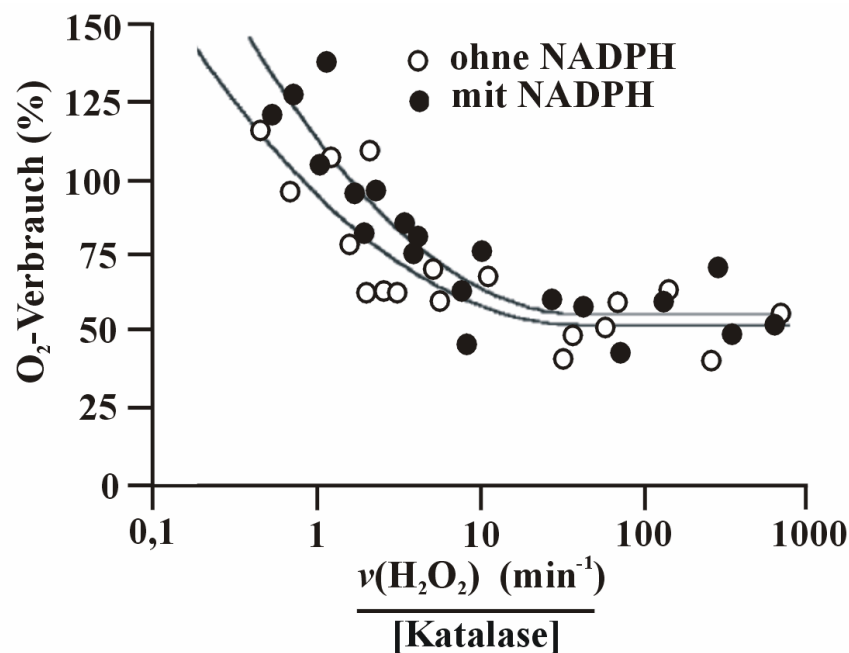


Abb. 7: Abhängigkeit des Sauerstoffverbrauches vom jeweils eingestelltem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis mit und ohne NADPH-Zugabe. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalasekonzentration: variabel; Aktivität (Glucoseoxidase): $4 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ (Glucoseoxidase-Konzentration: $0,4 \text{ nM}$); Glucose: 10 mM; DTPA: 100 μM ; NADPH (optional): 1 mM.

Wie sich zeigte, reagierte die Katalase oberhalb eines $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 10 min^{-1} wie erwartet; es kam zu einer Verringerung des Sauerstoffverbrauches nach Katala-

sezugabe um 50 %. Unterhalb eines $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 10 min^{-1} konnte der normalerweise erwartete Sauerstoffverbrauch von 50 % nicht mehr beobachtet werden. Dagegen wurde der Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch bei weiter sinkenden $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen immer geringer. Ab einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 1 min^{-1} war kein Einfluss der Katalase auf den Sauerstoffverbrauch mehr feststellbar. Interessanterweise stieg unterhalb eines $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 1 min^{-1} der Sauerstoffverbrauch sogar auf über 100 % an. Trotz hoher NADPH-Konzentrationen übte das Coenzym keinen Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch von Katalase unterhalb eines $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 10 min^{-1} mehr aus (vgl. Abb. 7). Anhand von Kontrollexperimenten, welche mit Xanthinoxidase durchgeführt wurden, zeigte sich das gleiche Ergebnis. Ebenfalls konnte mit Hilfe der Clark-Sauerstoffelektrode gezeigt werden, dass Katalase bei Abwesenheit von H_2O_2 keinen Sauerstoff aufnimmt. Es lässt sich festhalten, dass die katalase-typische, sauerstofffreisetzende Reaktion unterhalb eines $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 10 min^{-1} nicht mehr stattfindet und das Enzym hier andere Wege zur Reduktion beschreitet. Es ist zu vermuten, dass bei Abwesenheit von NADPH die Reduktion von Compound-I unter Nutzung eines „endogenous donors“ erfolgen könnte (vgl. Abb.1).

3.2. Bildung von Compound-I, -II, -III bei verschiedenen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen

Die Bildung der Compounds-I, -II, -III wurde sowohl bei niedrigen als auch bei hohen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen (1 min^{-1} bzw. 10 min^{-1}) untersucht. Diese $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse repräsentieren jeweils einen Bereich, in dem der typische, sauerstofffreisetzende Katalasezyklus sowie der nicht katalatische Reaktionszyklus vorliegen. Die Untersuchung der beiden $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse erfolgte mittels UV-VIS-Spektroskopie in einem Wellenlängenbereich zwischen 350 nm und 650 nm (vgl. Abb. 8). Aufgrund der unterschiedlichen Glucoseoxidaseaktivitäten und den hierdurch resultierenden unterschiedlichen Sauerstoffverbräuche durch die Glucoseoxidase, sind die Messzeiten auf die vorhandene Sauerstoffkonzentration im Puffer abgestimmt (Messungen erfolgten in einer Küvette ohne zusätzliche Sauerstoffzugabe). Da die Extinktionskoeffizienten für die Katalasespezies Compound-I und Compound-II relativ niedrig sind, wurde der in Frage kommende Wellenlängenbereich (470 bis 650 nm) fünffach vergrößert (vgl. Abb. 8).

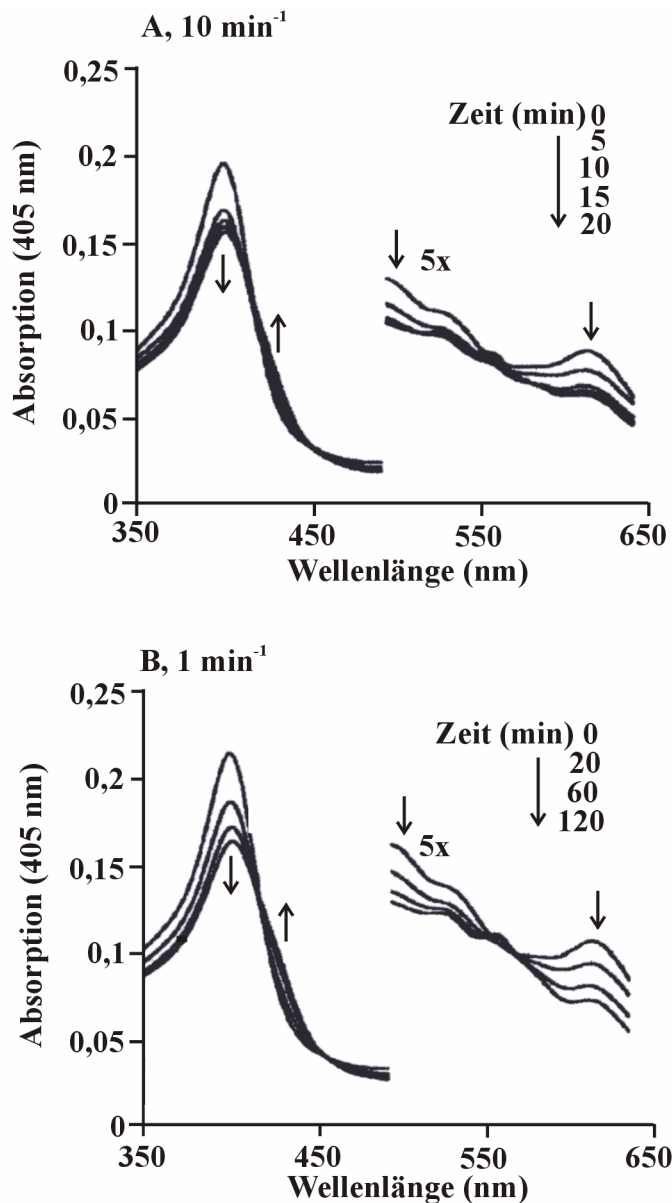


Abb. 8 A/B: UV-VIS-Spektren bei hohem (10 min⁻¹ (A)) und niedrigem (1 min⁻¹ (B)) $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis. Beide abgebildeten Experimente wurden jeweils ohne Zugabe von NADPH durchgeführt. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: je 0,6 μM ; Aktivität (Glucoseoxidase): 6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ (A) bzw. 0,6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ (B); Glucose: 10 mM; DTPA: 100 μM .

Bei beiden Versuchsreihen konnte das bekannte Reaktionsverhalten von Katalase beobachtet werden [11,30,32,33]. Zwischen den beiden Spektren konnten nahezu keine Unterschiede beobachtet werden. Jedoch konnte bei beiden ein Rückgang der Ferrikatalase (405 nm) verzeichnet werden, welcher zwischen der ersten Messung (0 min; ohne Glucoseoxidase) und der zweiten Messung (5 min bzw. 20 min nach Zugabe von Glucoseoxidase) deutlich stärker ausfiel (vgl. Abb. 8A: $\Delta_{\epsilon_{405\text{nm}}}=0,25$ bzw. Abb. 8B: $\Delta_{\epsilon_{405\text{nm}}}=0,28$), als bei den darauf folgenden Messungen. Grund hierfür ist die anfängliche Compound-I-Bildung (660 nm), bis sich

schließlich ein Gleichgewicht zwischen Aufbau und Abbau eingestellt hat. Neben Compound-I zeigte sich sowohl bei dem niedrigen als auch bei dem hohen $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis eine deutliche Bildung von Compound-II (vgl. Isosbestischer Punkt bei 435 nm). Jedoch konnte bei beiden untersuchten Versuchsreihen keinerlei Anzeichen für die Bildung von Compound-III festgestellt werden („twin peak“ bei 550 und 585 nm ^[32]).

3.3. Untersuchung der Absorption (405 nm) bei niedrigen bzw. hohen $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen

In den hier durchgeführten Experimenten wurde, simultan zum Versuch in Abb. 10, sowohl ein niedriges (1 min^{-1}) als auch ein hohes (10 min^{-1}) $(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis mittels UV-VIS-Spektroskopie untersucht. Hierzu wurden zu den jeweils angegebenen Messzeiten (vgl. Abb. 9) pro Messvorgang jeweils 1000 μl aliquotiert und mit Ethanol angereichert (Endkonzentration Ethanol 2 mM). Anschließend folgte eine 90minütige Inkubation bei 37°C . Die Inkubation mit Ethanol führt zu einer Rückführung der Katalaseintermediate zur Ausgangsform, da Compound-I durch Reaktion mit Alkohol zur Ferrikatalase reduziert wird. Compound-II reagiert nicht mit Ethanol; diese Spezies wird aber während der „langen“ Reaktionszeit mittels Freisetzung „eigener“, proteininterner Elektronen reduziert (weiteres Compound-II kann nicht mehr entstehen, da nachgebildetes Compound-I direkt durch Ethanol reduziert wird). Für das Abstoppen der Experimente ist die Wahl des Alkohols (Ethanol oder Methanol) von geringer Bedeutung, da beide Alkohole Compound-I mit der gleichen Geschwindigkeitskonstante ($10^3 \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) abbauen. Nach der Inkubation erfolgte eine Aufnahme der UV/VIS-Spektren bei einer Wellenlänge von 405 nm (vgl. Abb.9).

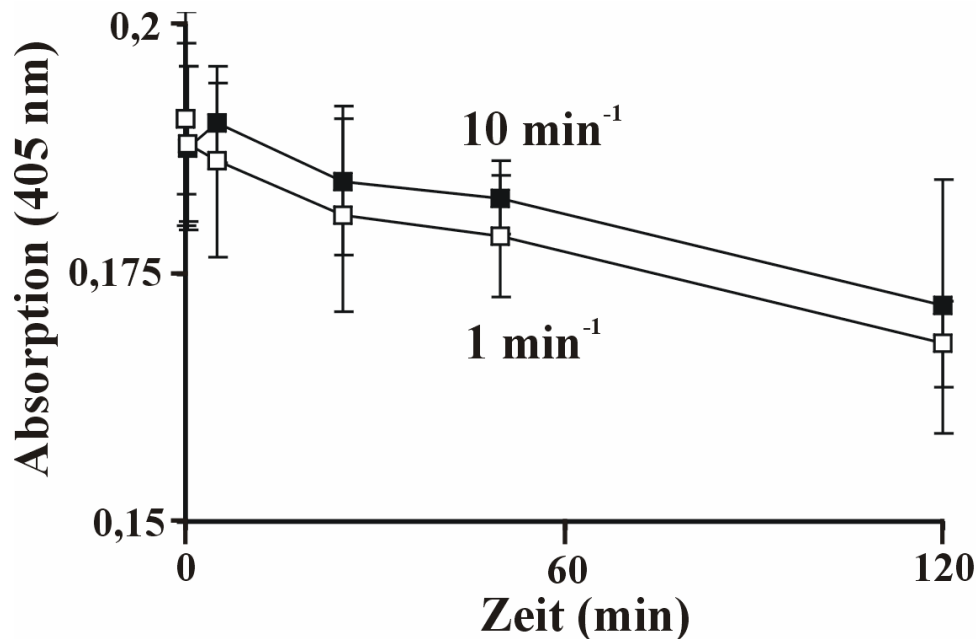


Abb. 9: Abnahme der Absorption (Ferrikatalase; 405 nm) bei unterschiedlichen Glucoseoxidaseaktivitäten. An den angegebenen Messpunkten wurden jeweils 1000 μ l Aliquot entnommen, mit 2 mM Ethanol 90 min bei 37°C inkubiert und mittels UV-VIS-Spektroskopie vermessen (405 nm). Es wurden die $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse 1 min^{-1} und 10 min^{-1} untersucht. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 0,6 μM ; Aktivität (Glucoseoxidase): 0,6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ ($v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis 1 min^{-1}) bzw. 6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1}$ ($v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse 10 min^{-1}); Glucose: 10 mM; Ethanol (Endkonzentration im Aliquot): 2 mM; DTPA: 100 μM .

Nach einer 120minütigen Reaktionszeit konnte bei den beiden $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen mehr als 80 % ursprünglich eingesetzten Ferrikatalase wieder gefunden werden. Insgesamt konnte bei einem niedrigerem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 1 min^{-1} eine Abnahme der UV/VIS-Absorption von ca. 10 % festgestellt werden; bei einem höheren $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 10 min^{-1} betrug die Abnahme der UV/VIS-Absorption insgesamt etwa 15 % von der ursprünglichen Absorption zum Beginn der Messung bei 0 min. Die Absorptionsabnahme (am Ende der beobachteten Reaktionszeit) kann nur durch eine Inaktivierung der Ferrikatalase erklärt werden. Eine Bildung von Compound-II kann ausgeschlossen werden, da nach 90minütiger Inkubation mit Ethanol alle gebildeten Compound-Spezies zu Ferrikatalase reduziert worden sind. Eine mögliche Begründung für die Inaktivierung kann durch die Bereitstellung von Elektronen durch den „endogenous donor“ begründet sein, wobei die Oxidationsvorgänge in der Proteindomäne zu einer Änderungen der Proteinstruktur führen können.

3.4. Untersuchung der katalytischen Aktivität nach Inkubation von Rinderleberkatalase mit unterschiedlichen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen

Ähnlich dem Experiment 3.3. wurden erneut zwei unterschiedliche $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse durch Variierung der Glucoseoxidaseaktivität eingestellt. Im Gegensatz zu vorher wurde bei diesem Experiment nicht die Ferrikatalase-Konzentration gemessen, sondern die katalytische Aktivität des Enzyms bei unterschiedlichen (Glucoseoxidase-abhängigen) H_2O_2 -Fluxen ($v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse 1 min^{-1} bzw. 10 min^{-1}). Zur Durchführung wurden an den entsprechenden Messpunkten Aliquots entnommen (vgl. Abb. 10), entsprechend mit temperiertem Phosphatpuffer ($\text{pH}=7,0$) verdünnt und die katalytische Aktivität bestimmt. Hierzu wurden pro Messung jeweils $10 \text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 zu der verdünnten Katalase zugegeben, gemischt und anschließend sofort die Absorption bei einer Wellenlänge von 240 nm (vgl. Anhang 8.3.) mittels UV/VIS-Spektroskopie gemessen.

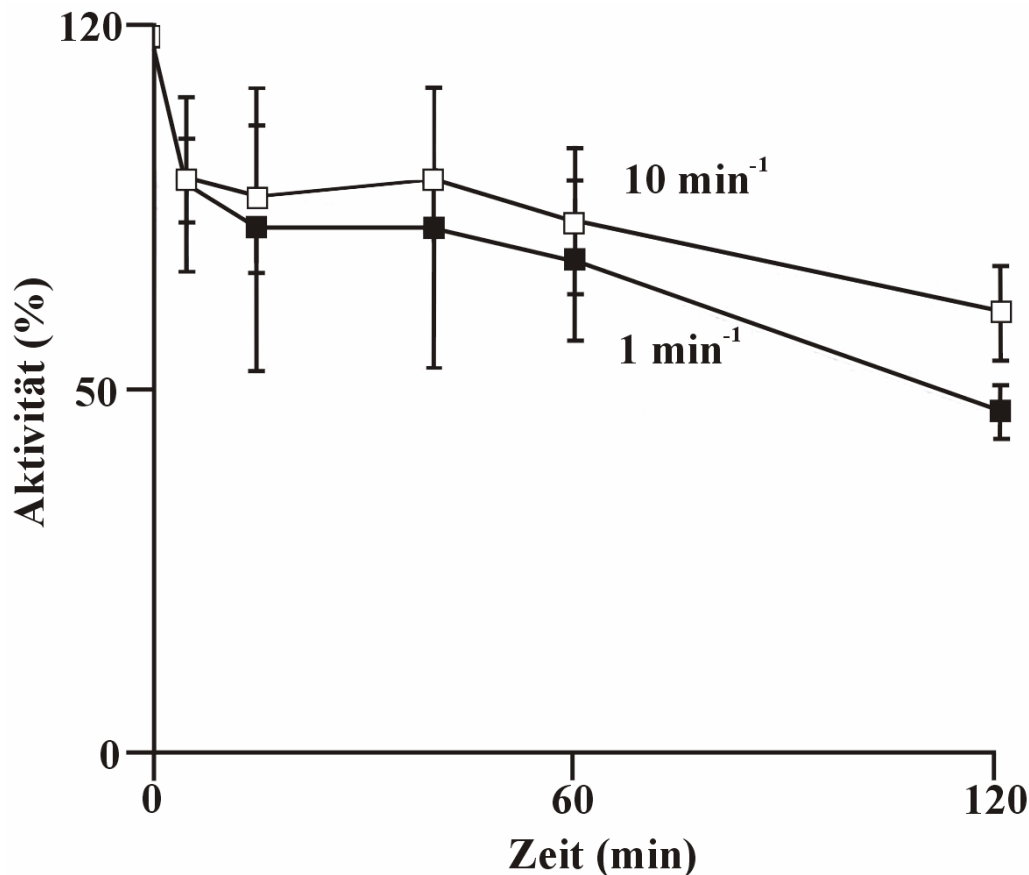


Abb. 10: Abnahme der katalytischen Aktivität von Rinderleberkatalase nach Inkubation mit hohem und niedrigem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen (1 min^{-1} bzw. 10 min^{-1}). K_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase (im Reaktionsansatz): jeweils 0,6 μM ; Aktivität (Glucoseoxidase im Reaktionsansatz): 0,6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ (1 min^{-1}) bzw. 6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \times \text{min}^{-1}$ (10 min^{-1}); Glucose: 10 mM; Bestimmung der katalytischen Aktivität mittels UV-VIS Spektroskopie durch Verfolgung des H_2O_2 -Abbaues bei 240 nm (genaue Durchführung siehe Text bzw. Material und Methoden): 10 mM; DTPA 100 μM .

In Abb. 10 wurde die Abnahme der katalytische Aktivität (prozentual; in Bezug auf die katalytische Aktivität am Anfang der Reaktion (bei 0 min)) gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Zunächst konnte ein starker Aktivitätsverlust innerhalb der ersten 5 Minuten nach Reaktionsstart beobachtet werden. Hierbei sank die Aktivität der Katalase bei beiden $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen um 18 % ab, wobei der beobachtete Aktivitätsverlust unabhängig vom gewähltem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis war. In den folgenden 55 Minuten konnte keine merkliche Abnahme der Aktivität festgestellt werden. Jedoch konnte nach einer Reaktionszeit von 120 min ein deutlicher Aktivitätsverlust beobachtet werden. Hierbei betrug die Restaktivität für das niedrige Verhältnis (0,6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$) etwa 47 %. Im Gegensatz dazu konnte bei einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 10 min^{-1} (6 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$) eine Restaktivität von etwa 63 % vorgefunden werden. Eine Beeinflussung der Absorptionen bei

Ergebnisse

240 nm durch Protein (Katalase und Glucoseoxidase) ist zu vernachlässigen, da sich im Reaktionsansatz beide Enzyme in nanomolarer Konzentration befinden (vgl. Material und Methoden „Bestimmung der Katalase-Aktivität mittels UV/VIS-Spektroskopie“).

Da unter den angegebenen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen eine Compound-III-Bildung ausgeschlossen ist (vgl. Abb. 8), ist der Aktivitätsverlust eventuell durch eine stattfindende Compound-II-Bildung erklärbar. Um weitere Daten für den oben beschriebenen Verlauf zu sammeln, wurden hierzu ähnliche Experimente mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode durchgeführt. Dazu wurden 2,5 μM Katalase mit einer Glucoseoxidaseaktivität von 2 μM min^{-1} inkubiert, was einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 0,8 min^{-1} entspricht (vgl. Abb. 11).

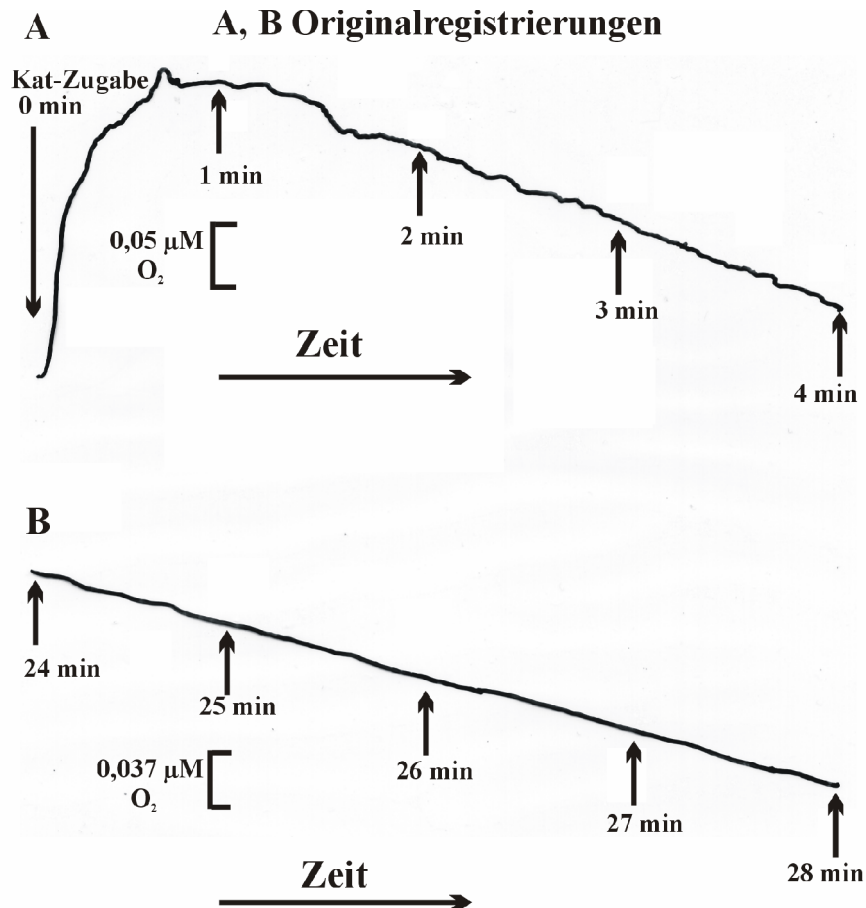


Abb. 11A/B: Messung der Sauerstoffabnahme durch das GOD/Katalase-System mittels Clark-Elektrode. Abb. A repräsentiert den Anfangsbereich (nach Katalase-Zugabe) und Abb. B den Endbereich der Messung (y-Achse O_2 -Konzentration) Reaktionszeit nach Katalase-Zugabe insgesamt 28 min. K_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: 2 μM ; Glucoseoxidaseaktivität: 2 $\mu\text{M min}^{-1}$ ($v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis 0,8 min^{-1}); DTPA: 100 μM .

In der beobachteten, 28minütigen Reaktionszeit (nach Katalase-Zugabe; vgl. Abb. 11A/B) konnte nur eine kleine Veränderung der Sauerstoffaufnahme durch die Katalase festgestellt werden (die Sauerstoffaufnahme des Gesamtsystems verringerte sich von anfangs 0,05 $\mu\text{M min}^{-1}$ auf insgesamt 0,037 min^{-1} nach 28 min). Insgesamt verringerte sich somit die Sauerstoffaufnahme um gut 26 %, was in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Aktivitätsmessung (vgl. Abb. 10) lag. Beim Vergleich des Ergebnisses mit Abb. 7 (vgl. Experiment 3.1.) fällt auf, dass es bei dem eingestellten $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 0,8 min^{-1} bereits zu einer Sauerstoffaufnahme seitens der Katalase kommt.

3.5. Oxidation des synthetischen Peroxidasubstrates Rhodamin-123 in Gegenwart unterschiedlicher $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse bei An- bzw. Abwesenheit von Additiven

Es wurden die beiden $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse $0,5 \text{ min}^{-1}$ und 25 min^{-1} untersucht und das produzierte Rhodamin-123 pro gebildetem H_2O_2 aufgetragen (vgl. Abb. 12). Die Durchführung erfolgte (mittels UV/VIS-Spektroskopie) direkt in einer Küvette. Eine Bestimmung der Konzentration des gebildetem Rhodamin-123 erfolgte unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten.

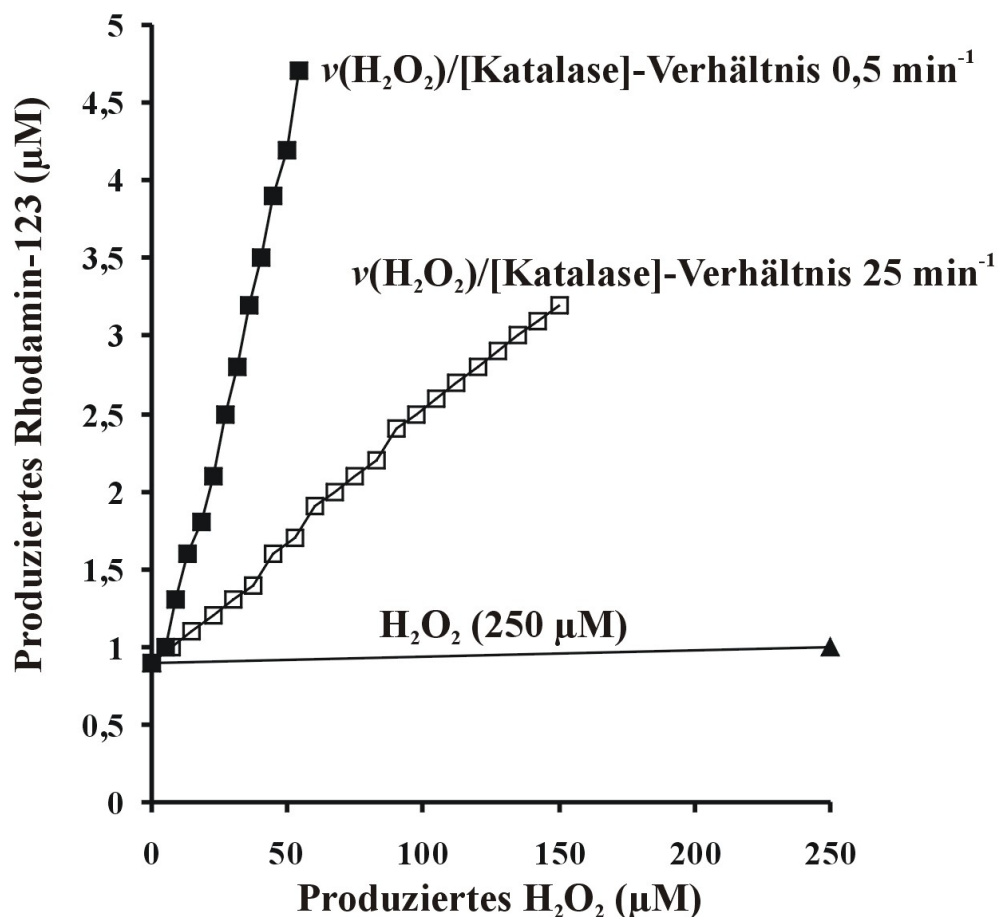


Abb. 12: Gebildetes Rhodamin-123 pro gebildetem H_2O_2 -Molekül in Abhängigkeit vom eingestellten $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis. Es wurden die Verhältnisse $0,5 \text{ min}^{-1}$ (Glucoseoxidaseaktivität: 5 nM s^{-1}) bzw. 25 min^{-1} (Glucoseoxidaseaktivität: 250 nM s^{-1}) untersucht. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 0,6 µM; Glucoseoxidase: 0,03 nM ($0,5 \text{ min}^{-1}$) bzw. 1,5 nM (25 min^{-1}); Dihydrorhodamin-123: 100 µM; DTPA: 100 µM.

Ergebnisse

In beiden Fällen erfolgte eine Oxidation des Dihydrorhodamins-123 zu Rhodamin-123, wobei sich allerdings bei beiden Verhältnissen sehr unterschiedliche Rhodamin-123-Ausbeuten pro produziertem H_2O_2 zeigten (vgl. Abb. 12). Hierbei lag das Verhältnis von generiertem Rhodamin-123 pro GOD-generiertem H_2O_2 bei dem niedrigen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis ($0,5 \text{ min}^{-1}$) mit 0,087 (Berechnung: produzierte H_2O_2 [μM] geteilt durch produziertem Rhodamin-123 [μM]) etwa viermal höher als bei einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 25 min^{-1} (hier lag das Rhodamin-123/ H_2O_2 -Verhältnis bei 0,021). Zur Überprüfung der gewonnenen Ergebnisse wurde in einem Kontrollexperiment anstelle von Glucoseoxidase direkt H_2O_2 zugefügt ($250 \mu\text{M}$). Bei diesem Experiment konnte keine Rhodamin-123-Produktion beobachtet werden. Die beobachtete basale Fluoreszenz (ohne zugesetztes H_2O_2 (bei $0 \mu\text{M} \text{H}_2\text{O}_2$)) lässt sich sehr wahrscheinlich durch eine geringe Autoxidation des Farbstoffes erklären. Grund hierfür ist das Vorhandensein von gelöstem Sauerstoff (ca. $213 \mu\text{M}$ bei 37°C ; vgl. Abb. 26) bzw. von geringen Mengen an H_2O_2 , welche aus Wasser in Gegenwart von z.B. Sonnenlicht gebildet werden können. Zur Überprüfung der Rhodamin-123-Produktion in Gegenwart verschiedener Additive (Ascorbinsäure, NADPH), wurde diese zu einem eingestellten $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 25 min^{-1} zugegeben und die gewonnenen Ergebnisse in Abbildung 13 zusammengefasst (Endkonzentration der Additive jeweils 1 mM).

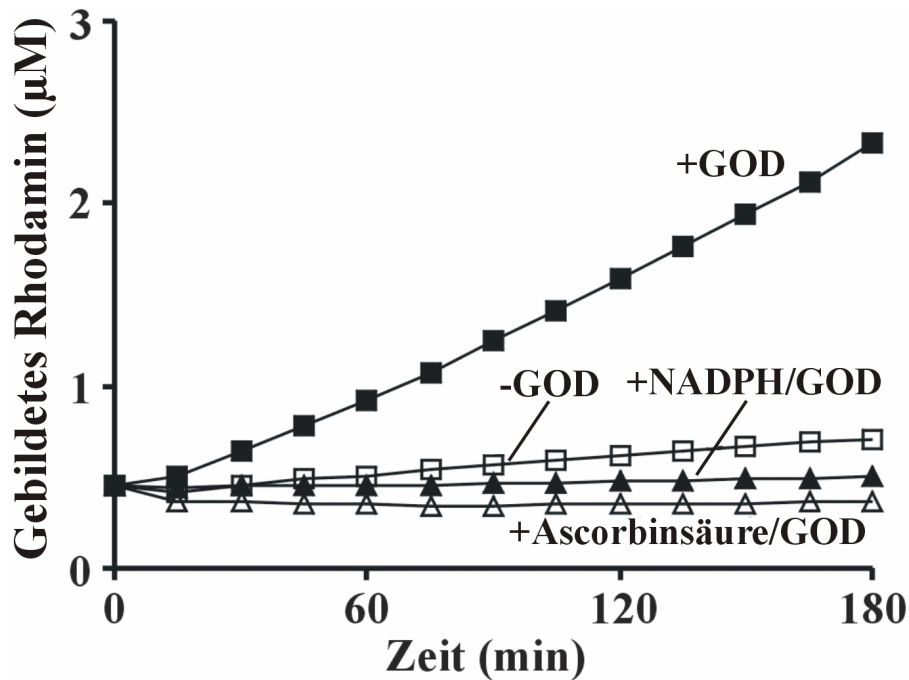


Abb. 13: Gebildetes Rhodamin-123 bei einem $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 25 min^{-1} (Glucoseoxidaseaktivität: 250 nM s^{-1}) in Ab- und Anwesenheit verschiedener Additive (Ascorbinsäure, NADPH). $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM ; $\text{pH}=7,0$; 37°C); Katalase: jeweils $0,6 \text{ }\mu\text{M}$; Glucoseoxidaseaktivität: $15 \text{ }\mu\text{M min}^{-1}$ (entspricht einem $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 25 min^{-1}); Dihydrorhodamin-123: $100 \text{ }\mu\text{M}$; DTPA: $100 \text{ }\mu\text{M}$.

Wie auch schon in den Experimenten zuvor, zeigte sich bei einem $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 25 min^{-1} auch hier eine Oxidation des Dihydrorhodamins-123 (vgl. Abb. 13; Kontrollexperiment (+ GOD)). Insgesamt wurden nach einer Reaktionszeit von 180 Minuten $2,3 \text{ }\mu\text{M}$ Rhodamin-123 gebildet. Dagegen konnte durch die Zugabe von 1 mM Additiv (Ascorbinsäure bzw. NADPH) eine Oxidation des Dihydrorhodamin-123 praktisch komplett inhibiert werden. Bei der Kontrolle (- GOD), welche weder Additiv noch Glucoseoxidase enthielt, wurden dagegen innerhalb der beobachteten Reaktionszeit (180 Minuten) nur etwa $0,1 \text{ }\mu\text{M}$ Rhodamin-123 gebildet. Anhand der Ergebnisse der Versuche in Abb. 13 konnte die protektive Wirkung von Ascorbinsäure bzw. NADPH gezeigt werden, da beide Additive zu einer Verminderung der Rhodamin-123-Bildung durch Compound-I führten. Da gebildetes Compound-I Radikalcharakter ($\text{Por-Fe}^{(4+)}\text{-Proteinradikal-Kation}$) besitzt und die beiden zugefügten Additive (Ascorbinsäure und NADPH) Antioxidantien darstellen, kann das gebildete Compound-I-Radikalkation durch die Additive reduziert werden ^[11,85,86]. Weil der Reaktionsmechanismus der Reduktion von Compound-I durch Ascorbinsäure bzw. NADPH wahrscheinlich unterschiedlich abläuft, ist neben der Beobachtung der Reduktion des Proteinradikalkations durch das Dihydrorhodamin-123 auch die Beobachtung der Compound-II-Bildung von

besonderem Interesse. Dihydrorhodamin-123 ist in der Lage, bei der Oxidation durch geeignete Oxidationsmittel Elektronen abzugeben. Das Molekül kann daher als Donor-Substanz für Peroxidasen eingesetzt werden ^[86]. Im Gegensatz zu niedermolekularen Alkoholen, wie etwa Ethanol, ist Dihydrorhodamin-123 mit einem Molekulargewicht von 346 g mol^{-1} deutlich schwerer und somit auch von den Molekülabmessungen wesentlich größer als Ethanol. Daher wird das Dihydrorhodamin-123 nicht durch den relativ engen, hydrophoben Main-Channel passen und kann somit nicht bis zur reaktiven Hämgruppe gelangen. Die Oxidation von Dihydrorhodamin-123 kann daher nicht direkt am Eisenatom der zentralen Häm-Gruppe erfolgen, wobei es nach neuesten Erkenntnissen wahrscheinlich zu einer Oxidation des Dihydrorhodamin-123 in der NADPH-Bindungstasche kommt ^[87]. Katalase reagiert natürlich nicht als „klassische Peroxidase“, da hierbei das Peroxidasesubstrat Dihydrorhodamin-123 als Elektronendonator für die Reduktion dient und keine weiteren Peroxide oxidiert werden.

3.6. Effizienz der Dihydrorhodamin-123-Oxidation durch Compound-I in Gegenwart verschiedener Additive (Ascorbinsäure bzw. NADPH)

Die Generierung von Compound-I erfolgte durch Zugabe von $250 \text{ }\mu\text{M}$ Peressigsäure in eine zuvor auf $1 \text{ }\mu\text{M}$ eingestellte Ferrikatalase-Lösung. Die Bestimmung des produzierten Rhodamin-123 wurde mittels UV-VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 500 nm verfolgt. Zusätzlich wurde die Dihydrorhodamin-123-Produktion bei Zugabe verschiedener Additive (Ascorbinsäure bzw. NADPH; jeweils $100 \text{ }\mu\text{M}$) untersucht. Die Konzentrationsberechnung erfolgte unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten.

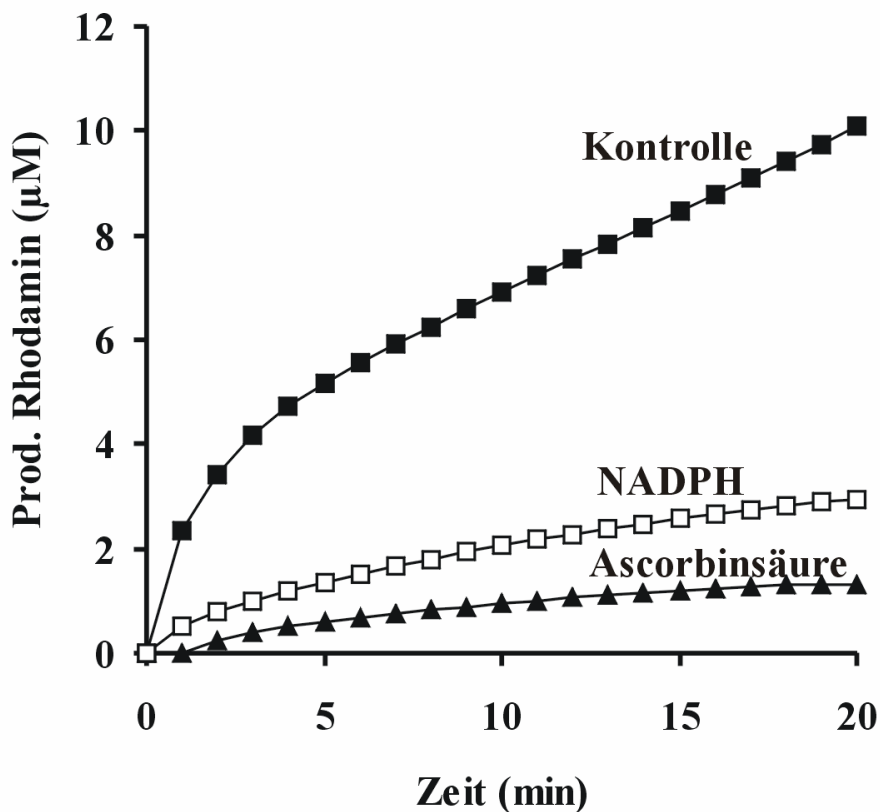


Abb. 14: Oxidation von Dihydrorhodamin-123 zu Rhodamin-123 durch Compound-I in Ab- und Anwesenheit verschiedener Additive (Ascorbinsäure bzw. NADPH). $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 1 µM; Dihydrorhodamin-123: 100 µM; Additive (Ascorbinsäure, NADPH): jeweils 100 µM; Peressigsäure (zur Compound-I Herstellung): 250 µM; DTPA: 100 µM.

Innerhalb der gesamten Reaktionszeit von 20 Minuten (vgl. Abb. 14) wurden bei der Kontrolle (nur Katalase und Peressigsäure) insgesamt 10,1 µM Rhodamin-123 produziert. Durch Zugabe von Antioxidantien (Ascorbinsäure bzw. NADPH) wurde die Rhodamin-123-Bildung deutlich erniedrigt und betrug bei Zugabe von NADPH am Ende der Reaktionszeit nur noch 3 µM (entspricht 30 % der Kontrollmessung). Durch Zugabe von Ascorbinsäure konnte die Rhodamin-123-Produktion noch weiter gesenkt werden und betrug am Ende der beobachteten Reaktionszeit noch 1,3 µM (entspricht 13 % der Kontrollmessung). Im Gegensatz zum vorherigen Versuch (vgl. Abb. 12), wo Glucoseoxidase als H_2O_2 -Quelle diente, wurde hier Compound-I direkt durch Reaktion mit Peressigsäure generiert. Im Gegensatz zu Abb. 12, ist hier eine hundertprozentige Reduktion von Compound-I gegeben (im vorher beschriebenen Versuch kann eine alleinige Reduktion von Compound-I durch Dihydrorhodamin-123 nicht gewährleistet werden, da die von Glucoseoxidase produzierten H_2O_2 -Moleküle ganz bzw. teil-

weise (abhängig von der eingestellten Glucoseoxidaseaktivität) zu einer Reduktion von Compound-I führten (Konkurrenz zwischen gebildetem H_2O_2 und Dihydrorhodamin-123 um Compound-I)). Wahrscheinlich verlaufen die Kurven (im Anfangsbereich) aufgrund von Compound-II-Bildung und der damit verbundene langen Halbwertszeit für die Reduktion nicht linear.

Um zu untersuchen, wie Ascorbinsäure bzw. NADPH das Dihydrorhodamin-123 vor der Oxidation durch die Katalase schützen, ist es wichtig, die genauen Abbaugeschwindigkeiten der Compound-I Reduktion zu kennen. Hierzu sind Experimente zur Bestimmung der Compound-I-Abbauraten (k_{app}) ohne Zugabe von Dihydrorhodamin-123 notwendig.

3.7. Bestimmung der Compound-I-Abbauraten (k_{app}) in Gegenwart verschiedener Additive (Ascorbinsäure, NADPH u. Ethanol)

Die Herstellung von Compound-I erfolgte durch Zugabe von Peressigsäure zu einer Katalaselösung (3 x Überschuss der Häm-Äquivalenten; vgl. erster Pfeil Abb. 15). Nach einer Reaktionszeit von 55 Sekunden wurden die Additive (Ascorbinsäure, Ethanol bzw. NADPH; vgl. zweiter Pfeil Abb. 15) zugefügt. Die Bildung bzw. der Abbau von Compound-I kann gut mittels UV/VIS-Spektroskopie verfolgt werden. Da Compound-I seine höchste Absorption bei einer Wellenlänge von 660 nm zeigt, erfolgte die Beobachtung der Compound-I-Entwicklung daher im roten Spektralbereich ^[88]. Die Abschätzung der gefundenen Abbauraten (k_{app}) erfolgte mit Ethanol als Referenzsubstanz.

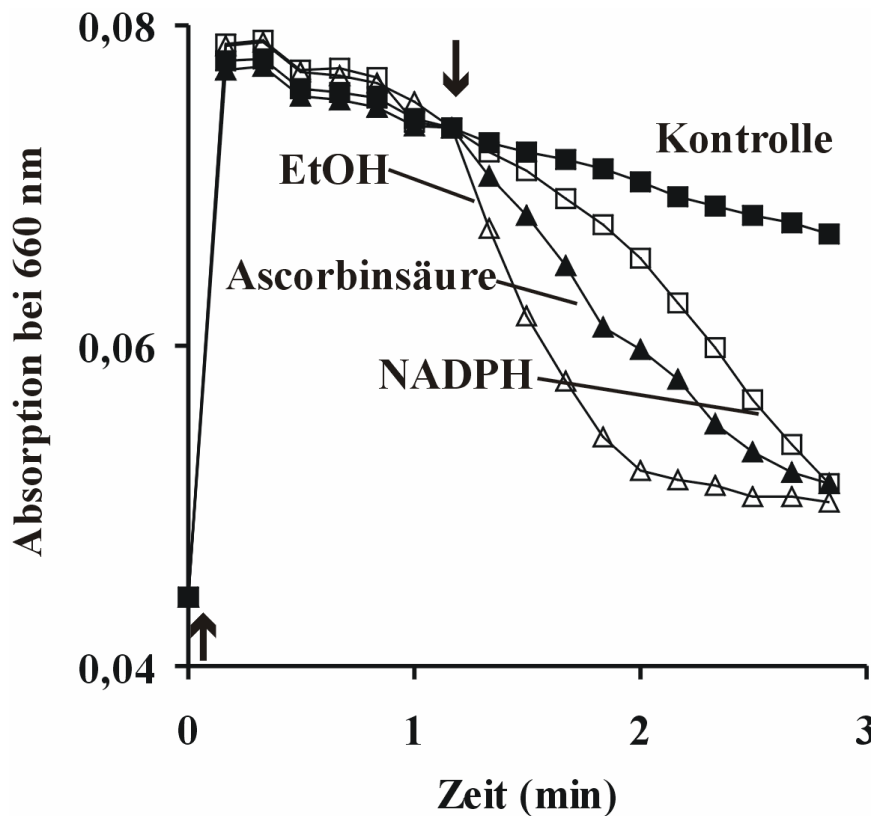


Abb. 15: Unterschiedliche Compound-I-Abbauraten (k_{app}) in Gegenwart verschiedener Additive (Ascorbinsäure, Ethanol, NADPH). Compound-I-Generierung durch Peressigsäure (Zugabe siehe erster Pfeil); Zugabe der Additive siehe zweiter Pfeil. K_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 2,5 μ M; Additive (Ascorbinsäure, Ethanol, NADPH): je 30 μ M; Peressigsäure: 30 μ M; DTPA: 100 μ M.

Durch die Zugabe der Peressigsäure erfolgte eine sofortige Compound-I Bildung, was sich in einem Anstieg der Absorption bei 660 nm zeigte (vgl. Abb. 15). In einem Kontroll-Experiment, welches kein Additiv enthielt, zeigte sich ein kontinuierlicher Abbau des Compound-I-Intermediates. Die abgeleitete scheinbare Geschwindigkeitskonstante (alle Konstanten sind abgeschätzt gegenüber Ethanol als Referenzsubstanz) des Abbaues (k_{app}) betrug hier (37°C) $4,2 \pm 0,2 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, wobei das Ergebnis gut mit dem von Nicholls^[4] angegebenen Wert von $2 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei 25°C übereinstimmt. Wurde als Additiv Ethanol zugefügt, so führte dies zu einem beschleunigten Abbau von Compound-I ($k_{app} = 1 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Wurde Ethanol jedoch durch Ascorbinsäure ersetzt, so führte dies ebenfalls zu einem exponentiellen Abbau des Katalase-Intermediates. Hierbei konnte für die Reaktion Compound-I + Ascorbinsäure eine scheinbare Geschwindigkeitskonstante von $k_{app} = 544 \pm 42 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden, was auch wieder sehr nahe an dem von Chance gefundenen Wert von $k_{app} = 330 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ^[89] heranreicht. Ebenfalls konnte durch Zugabe von NADPH die Compound-I-Absorption exponentiell gesenkt werden, wobei für diese Reaktion eine scheinbare Geschwindigkeits-

konstante von $k_{app}=561 \pm 44 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ erhalten wurde. Interessanterweise haben die abgeschätzten Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}) der Reaktionen NADPH+Compound-I und Ascorbinsäure+Compound-I fast identische Werte, was darauf hindeuten könnte, dass beide Metaboliten an derselben Stelle oxidiert werden.

3.8. Additive-abhängige Compound-II-Bildung bei konstanten H_2O_2 -Fluxen in Anwesenheit von Xanthinoxidase-generierten $\text{O}_2^{\cdot-}$ Radikalen

Die hierbei durchgeführten Experimente dienten der Messung der Compound-II-Bildung sowie der Bestimmung der halbmaximalen Abbauraten bei unterschiedlichen Additiven (Ascorbinsäure/NADPH/Ethanol) ^[11]. Die Berechnung der gebildeten Compound-II-Konzentration erfolgte aus der Extinktion ($E_{435 \text{ nm}}$) unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten (vgl. Anhang). Als H_2O_2 -Quelle diente in diesem Experiment (wie auch in der oben erwähnten Veröffentlichung) nicht wie sonst Glucoseoxidase, sondern Xanthinoxidase, da dieses Enzym in der Lage ist, neben H_2O_2 auch $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikale zu generieren. Die hierbei entstehenden reaktiven Sauerstoff-Radikale führen nach bisheriger Ansicht bei der Reaktion mit Compound-I zu einer Compound-II-Bildung (vgl. Abb. 1 Reaktion 7). Außerdem wird bei der beschriebenen Reaktion Sauerstoff freigesetzt. Es wurde eine Xanthinoxidas-Aktivität von $7,91 \text{ U l}^{-1}$ eingesetzt. Nach der Zusammenstellung der jeweiligen Reaktionsansätze (Katalasekonzentration jeweils $2 \text{ } \mu\text{M}$) und nach einer Reaktionszeit von 10 Minuten erfolgte die spektroskopische Messung der Probe mittels UV/VIS-Spektroskopie. Alle untersuchten Additivkonzentrationen lagen in einem Konzentrationsbereich zwischen 0 und $2000 \text{ } \mu\text{M}$. In Abbildung 16 ist die Compound-II-Bildung in Abhängigkeit von der zugefügten Additiv-Konzentration aufgezeichnet:

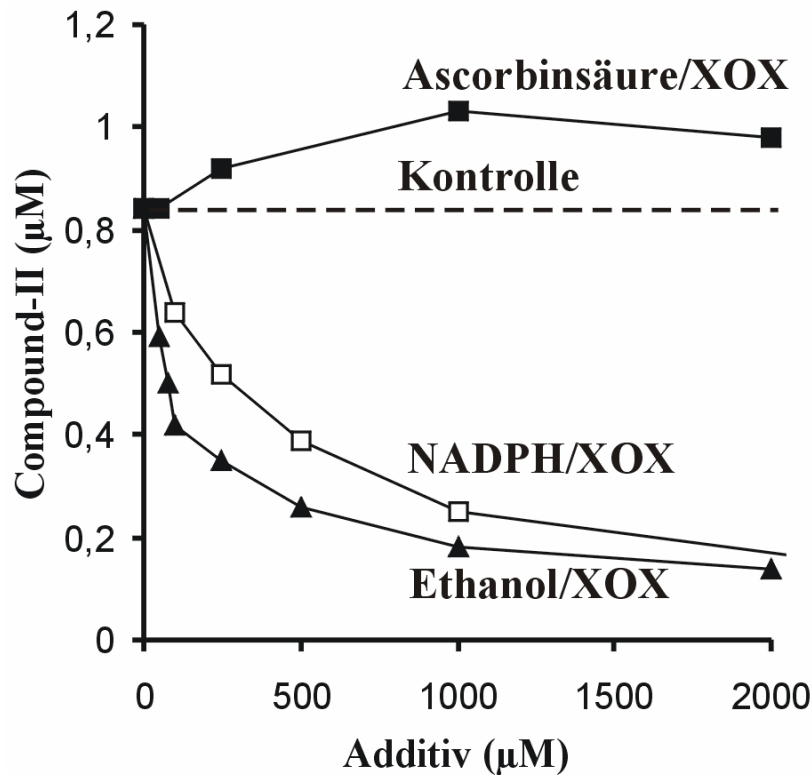


Abb. 16: Abhängigkeit der Compound-II-Bildung von der Additiv-Konzentration in Gegenwart eines Xanthinoxidase-generierten H_2O_2 -Fluxes (unbestimmte Menge an $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Radikalanionen). Bestimmung der Compound-II-Bildung nach einer Reaktionszeit von jeweils 10 min. K_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 2 µM; Xanthinoxidaseaktivität: je 7,91 U l⁻¹; Additive (Ethanol, NADPH): 0 - 2000 µM; DTPA: 100 µM.

Zu dem Katalase/Xanthinoxidase-System wurden verschiedene Additive (Ein-Elektronen-Donatoren bzw. Zwei-Elektronen-Donatoren) zugefügt (0-2000 µM). In Abwesenheit der Additive (Kontrolle) wurde durch das $\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2^{\cdot-}$ -generierende System insgesamt 0,8 µM Compound-II gebildet. Im Gegensatz zu den Zwei-Elektronen-Donatoren (NADPH, Ethanol), wo bei steigender Additiv-Konzentration die Compound-II-Konzentration erniedrigt wurde, zeigte sich bei dem zugefügten Ein-Elektronen-Donator (Ascorbinsäure) eine Compound-II-Steigerung. Bei zunehmender Ascorbinsäure-Konzentration stieg die Compound-II-Konzentration an, bis nach einer Zugabe von 740 µM ein Sättigungsniveau (1 µM Compound-II) erreicht wurde (vgl. Abb. 16). Wurde im Gegensatz Ethanol als Additiv eingesetzt, sank bei steigender Ethanolkonzentration die Compound-II-Konzentration exponentiell ab. Die gefundene halbmaximale Abbaurate wurde bei einer Ethanolkonzentration von 200 µM erreicht. Da Ethanol für eine direkte Reduktion von Compound-I bekannt ist ^[2,89,90,91], konnte auch bei Anwesenheit von $\text{O}_2^{\cdot-}$ Radikalanionen die Produktion von Compound-II unterdrückt

werden. Kirkman schloss in diesem Zusammenhang eine direkte Reaktion zwischen NADPH und Compound-I aus, da er durch Zugabe von 2 mM Ethanol die Compound-II-Bildung bei einer Xanthin/Xanthinoxidase-abhängigen Compound-II-Bildung unterdrücken konnte (vgl. Abb. 1) ^[11]. Dies gelang ihm aber nicht, wenn er Ethanol durch NADPH (2 μ M) substituierte ^[11]. An Kirkmans Interpretationen bestehen hinsichtlich der gefundenen Ergebnisse jedoch berechnete Zweifel, da in Abb. 16 gezeigt werden konnte, dass auch NADPH (ähnlich wie auch Ethanol) die Compound-II-Bildung bei steigender Konzentration effektiv verhindert. In diesem Zusammenhang konnte eine halbmaximale Abbaurate bei einer NADPH-Konzentration von 375 μ M gefunden werden. Jedoch verhindert Ethanol die Compound-II-Bildung wesentlich stärker als NADPH (die halbmaximale Abbaurate findet sich hier bei einer Ethanol-Konzentration von etwa 206 μ M (vgl. Abb. 16)).

3.9. Compound-II-Bildung bei physiologischen H₂O₂-Fluxen in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Additive

Die Durchführung der Experimente erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie jeweils in einer Küvette. Um einen Einblick in die Compound-II-Bildung bei unterschiedlichen Additiven zu erhalten, wurden 2,5 μ M Katalase mit einem H₂O₂-Flux von 83 nM H₂O₂ s⁻¹ inkubiert ($v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis 2 min⁻¹ (physiologischer Bereich ^[11]). Die Zugabe der Additive (Ascorbinsäure, NADPH) erfolgte, nachdem sich eine stabile Absorption bei 435 nm eingestellt hatte (vgl. Pfeil Abb. 17). In den Versuchen, welche Additive enthielten, betrugen deren Endkonzentration jeweils 75 μ M. Die Berechnung der gebildeten Compound-II-Konzentration erfolgte aus der Extinktion ($E_{435 \text{ nm}}$) unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten (vgl. Anhang).

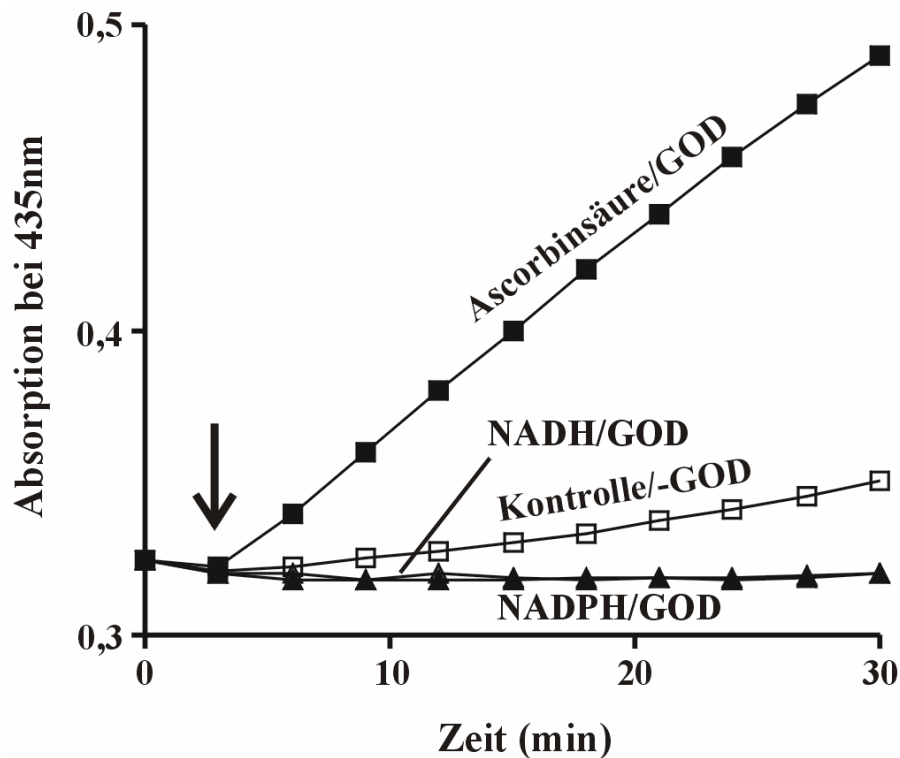


Abb. 17: Compound-II-Bildung bei physiologischen steady-state-Konzentrationen. Es wurde jeweils ein H_2O_2 -Flux von 83 nM s^{-1} in An- bzw. Abwesenheit verschiedener Additive (Ascorbinsäure, NADPH) eingestellt. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM ; $\text{pH}=7,0$; 37°C); Katalase: jeweils $2,5 \text{ }\mu\text{M}$; Additive (Ascorbinsäure, Ethanol, NADPH): je $75 \text{ }\mu\text{M}$; DTPA: $100 \text{ }\mu\text{M}$.

Wie in Abb. 17 ersichtlich, stieg bei der Kontrollmessung die Absorption bei einer Wellenlänge von 435 nm (Compound-II-Bildung) deutlich an. Insgesamt wurden ca. $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ Compound-II ($\epsilon_{435\text{nm}} = 32 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) während der Reaktionszeit gebildet. Die Zugabe eines Ein-Elektronen-Reduktionsmittels, wie in diesem Fall Ascorbinsäure, steigerte die Absorption im Gegensatz zur Kontrolle beachtlich (6,5-mal). Insgesamt stieg die gebildete Compound-II-Konzentration am Ende der beobachteten Reaktionszeit auf $1,3 \text{ }\mu\text{M}$ ($\epsilon_{435\text{nm}} = 32 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) an und liegt hiermit in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben ^[2,92,93]. Im Gegensatz zu dem durch Ascorbinsäure verursachten starken Anstieg der Absorption, wurde die Bildung von Compound-II durch die Zugabe des Coenzym NADPH komplett unterdrückt, wobei das Ergebnis auch in diesem Falle mit den Literaturwerten übereinstimmt ^[11,26]. Auch durch Zugabe von NADH erfolgte eine Unterdrückung der Compound-II-Bildung, welche sich mit der von NADPH deckt.

Anhand der gewonnenen Ergebnisse ist es möglich, die Compound-II-Bildung bzw. deren Verhinderung in Anwesenheit von Additiven näher zu charakterisieren. Dies war mit den Ergebnissen aus Abb. 16 noch nicht möglich, da dort der Compound-I-Abbau in An- bzw. Ab-

wesenheit von verschiedenen Additiven (Ascorbinsäure, NADPH u. Ethanol) unter nicht physiologischen Bedingungen erfolgte ^[11].

3.10. Bestimmung der Ferrikatalase u. Compound-II-Entwicklung bei Inkubation von Katalase mit physiologischen H₂O₂-Fluxen in An- bzw. Abwesenheit von Additiven

Für die Durchführung der Experimente wurden H₂O₂-Fluxe von 40 nM s⁻¹ durch Zugabe von 0,24 nM Glucoseoxidase eingestellt. Die Konzentration an Katalase betrug bei allen Versuchen jeweils 1,9 µM, was einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 1,3 min⁻¹ entspricht. Die Untersuchung der Ferrikatalase bzw. des Compound-II-Verlaufes erfolgten mittels UV/VIS-Spektroskopie in einer Küvette. NADPH wurde bei den Experimenten, ähnlich wie auch *in vivo*, enzymatisch im reduzierten Zustand gehalten. Die Endkonzentration des Coenzym betrug pro Versuch jeweils 40 µM. Bei allen Experimenten, welche mit Ascorbinsäure bzw. Ascorbinsäure + NADPH durchgeführt wurden, wurden jeweils 1 mM Ascorbinsäure zugefügt. Die Bestimmung der Ferrikatalase-Konzentrationen erfolgte mittels Extinktionskoeffizient bei einer Wellenlänge von 405 nm; die von Compound-II bei einer Wellenlänge von 435 nm.

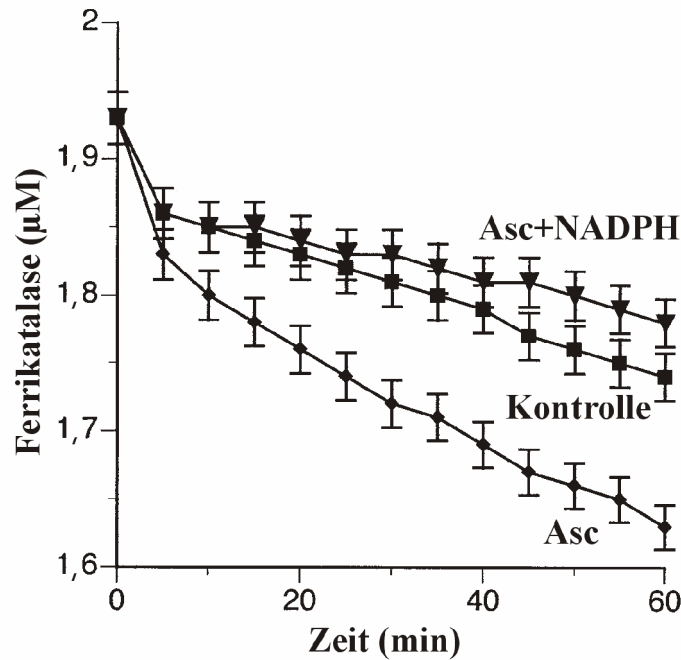


Abb. 18: Ferrikatalaseabbau bei geringen physiologischen H_2O_2 -Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit von Additiven (Ascorbinsäure, NADPH, Ascorbinsäure + NADPH). Das $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis betrug $1,3 \text{ min}^{-1}$; die Reduktion von NADP^+ erfolgte enzymatisch. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 1,9 μM ; Glucoseoxidase: 0,24 nM (entspricht einer Aktivität von $40 \text{ nM H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$); Ascorbinsäure: 1 mM; NADPH-Sytem: 40 μM NADPH; Glucose-6-phosphat-dehydrogenase-Aktivität 100 U l^{-1} ; Glucose-6-phosphat: 1 mM; DTPA: 100 μM .

Innerhalb der untersuchten Reaktionszeit von 60 min nahm die Ferrikatalasekonzentration bei der Kontrollmessung (nur Katalase und Glucoseoxidase; kein Additiv) um 0,17 μM ab (Endkonzentration 1,73 μM vgl. Abb. 18). Wurde Ascorbinsäure als Additiv eingesetzt, so verstärkte sich der Ferrikatalaseabbau stark. Insgesamt konnten nach einer Reaktionszeit von 60 min 1,56 μM Ferrikatalase bestimmt werden, was einer Abnahme der Ferrikatalasekonzentration um 0,34 μM entspricht (vgl. Abb. 18). Wurde zusätzlich zur Ascorbinsäure noch NADPH zugefügt, so verlangsamte sich der Ferrikatalaseverlust merklich und betrug nach 60minütiger Reaktionszeit lediglich noch 0,11 μM (Endkonzentration 1,79 μM (vgl. Abb. 18)). Um auch einen Einblick in die gebildete Compound-II-Konzentration zu erhalten, wurden die Spektren der oben beschriebenen Versuche bei einer Wellenlänge von 435 nm analysiert und die Compound-II-Konzentration mittels Extinktionskoeffizienten berechnet (vgl. Abb. 19):

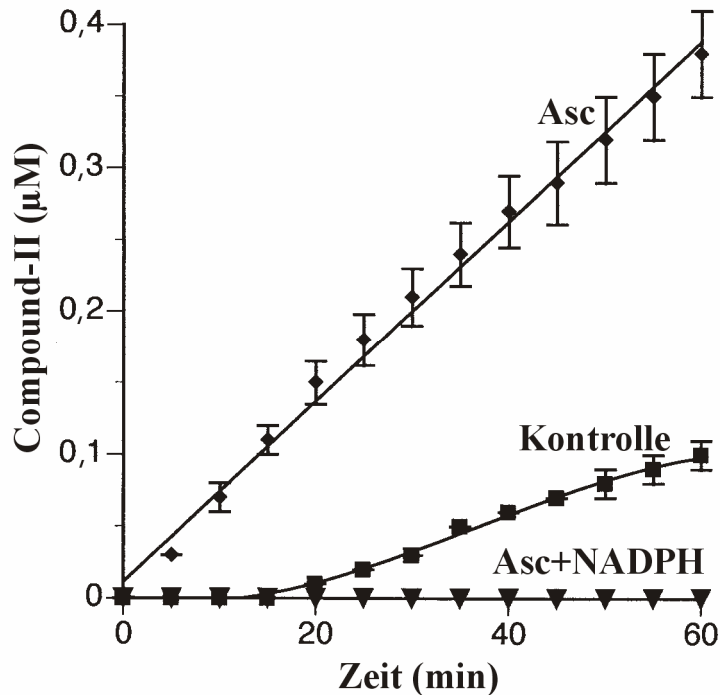


Abb. 19: Compound-II-Entwicklung bei geringen physiologischen H_2O_2 -Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit von Additiven (Ascorbinsäure, NADPH, Ascorbinsäure + NADPH). Die Erstellung der Abbildung erfolgte aus den gleichen Spektren wie in Abb. 18. Somit entsprechen alle Konzentrationen denen in Abb. 18.

Bei der Kontrollmessung (nur Katalase und Glucoseoxidase) stieg die Compound-II-Bildung innerhalb der 60minütigen Reaktionszeit auf insgesamt $0,1 \mu\text{M}$ Compound-II an (vgl. Abb. 19). Die aufgetretene Induktionsperiode (Anstieg der Compound-II-Bildung erfolgte erst nach etwa 5 min) war reproduktiv; konnte aber nicht erklärt werden. Wurde dagegen Ascorbinsäure als Additiv zugegeben, so erhöhte sich die Compound-II-Bildung merklich und betrug nach 60 min insgesamt $0,38 \mu\text{M}$, wobei der gefundene Wert gut mit den von Chance gefundenen Werten übereinstimmt ^[85]. Interessanterweise war bei der kombinierten Zugabe von Ascorbinsäure und des NADPH-Systems praktisch keine Compound-II-Bildung mehr feststellbar (vgl. Abb. 19), obwohl die Ascorbinsäurekonzentration mit 1 mM um den Faktor 25 höher konzentriert worden war als das Coenzym mit einer Konzentration von lediglich $40 \mu\text{M}$. Auf eine Messung mit alleiniger Zugabe von NADPH wurde verzichtet, da bereits in Abb. 17 die Verhinderung der Compound-II-Bildung gezeigt wurde und dies außerdem durch Kirkman ^[11] nachgewiesen werden konnte.

3.11. Bestimmung des bevorzugten Reaktionszyklus von Katalase bei verschiedenen H₂O₂-Fluxen und physiologischen NADPH-Konzentrationen

Um in den Experimenten ähnliche Bedingungen wie *in vivo* zu generieren, wurden jeweils 40 µM NADPH (Reduktion des oxidierten NADP⁺-Kations erfolgte durch Glucose-6-phosphat-dehydrogenase), 2 µM Katalase sowie ein glucoseoxidaseabhängiger H₂O₂-Flux (Aktivitäten hierbei zwischen 8,3 s⁻¹ und 830 nM s⁻¹) eingesetzt. Die Verfügbarkeit des Coenzym wird unter physiologischen Bedingungen in Zellen nicht durch die Konzentration an NADPH sondern vielmehr durch eine effiziente Reduktion des NADP⁺-Kations aufrechterhalten. Jede untersuchte Glucoseoxidaseaktivität wurde in An- und Abwesenheit von NADPH untersucht (in Abb. 20 A/B wurden exemplarisch die Ferrikatalase-Abnahmen zweier unterschiedlicher Glucoseoxidaseaktivitäten (Abb. 20 A: 8,3 nM s⁻¹; Abb. 20 B: 166 nM s⁻¹) dargestellt).

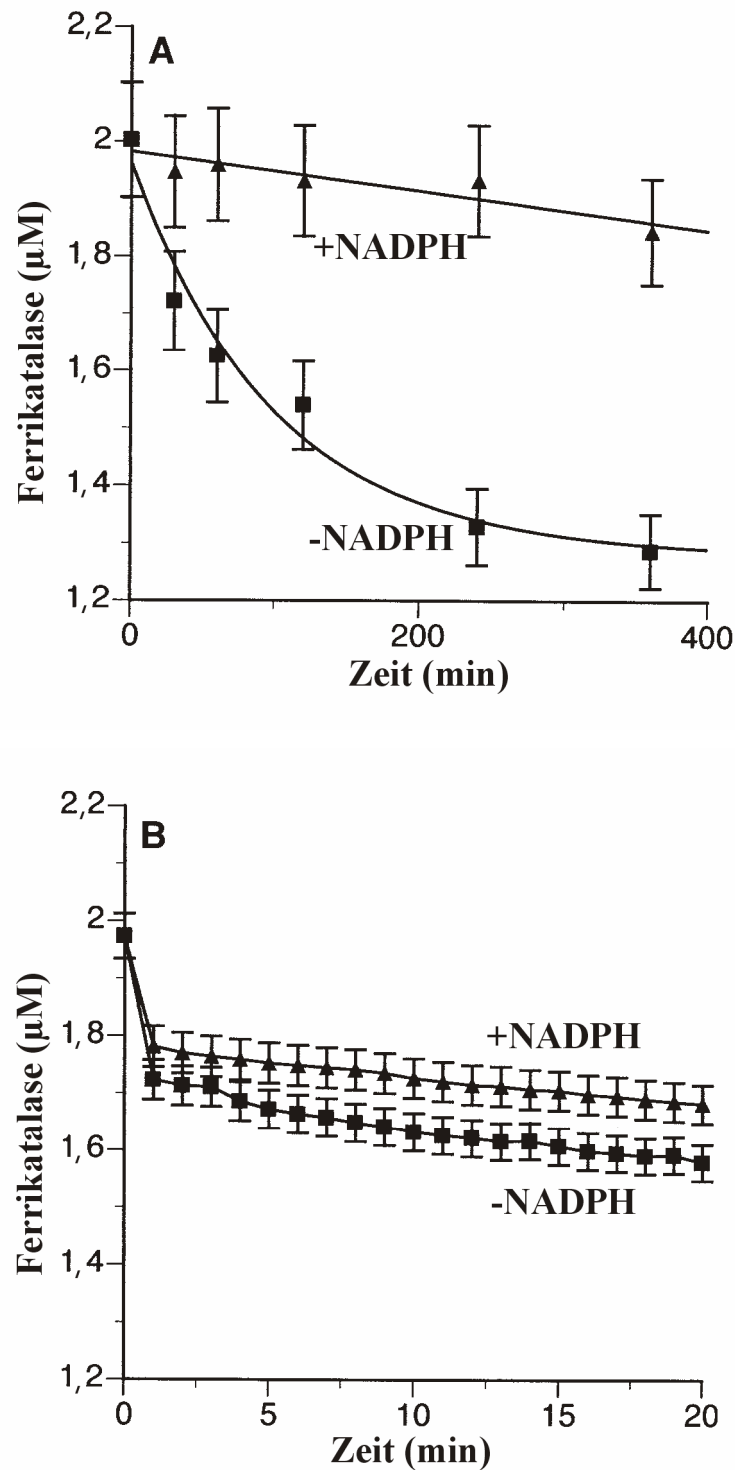


Abb. 20 A/B: Ferrikatalaseabnahme bei unterschiedlichen H_2O_2 -Fluxen (Abb. A: $8,3 \text{ nM s}^{-1}$; Abb. B: 166 nM s^{-1}) in An- und Abwesenheit von NADPH. K_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils 2 μM ; Glucoseoxidase: 0,05 nM bis 5 nM ($8,3 \text{ nM s}^{-1}$ bis 830 nM s^{-1}); NADPH-System: 40 μM NADPH; Glucose-6-phosphatdehydrogenaseaktivität 100 U l^{-1} ; Glucose-6-phosphat: 1 mM; DTPA: 100 μM .

Ergebnisse

In Abwesenheit von NADPH verringerte sich die Ferrikatalase-Konzentration (vgl. Abb. 20 A) um insgesamt $0,71 \mu\text{M} \pm 0,06 \mu\text{M}$, was einem Abbau von 35 % entspricht. Durch Zugabe von NADPH konnte der Ferrikatalaseverlust jedoch deutlich verringert werden (vgl. Abb. 20 A). Insgesamt betrug dieser bei Anwesenheit von NADPH lediglich noch 8 %, was einem Verlust von umgerechnet $0,16 \mu\text{M} \pm 0,1 \mu\text{M}$ entspricht. Dagegen nahm der Einfluss des Coenzym auf die Reaktion bei hohen H_2O_2 -Fluxen merklich ab und es konnten hierbei kaum Unterschiede zwischen den beiden Versuchen mit bzw. ohne NADPH festgestellt werden (Abb. 20 B). Jedoch wurde bei dieser Glucoseoxidaseaktivität in beiden Experimenten (vgl. Abb. 20 B mit bzw. ohne NADPH) eine 34 % Abnahme der Ferrikatalase beobachtet. Diese Abnahme beruht auf der Compound-I-Bildung und kann mit den gegebenen Geschwindigkeitskonstanten ^[19] der beiden Teilschritte des katalatischen Zyklus (Gl. 2: $k=0,6 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; Gl. 3: $k=1,8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) nachvollzogen werden. Hierbei wird gebildetes Compound-I nicht augenblicklich abgebaut; es akkumuliert, da die Geschwindigkeitskonstante für die Reduktion von Compound-I kleiner ist als die Geschwindigkeitskonstante für die Oxidation der Ferrikatalase. Der Grund, warum die Ferrikatalase-Konzentration bei der Zugabe von NADPH gar nicht oder nur sehr gering abfällt, ist hiermit zu begründen, dass das NADPH (vermutlich) direkt, ohne Intermediat-Bildung, Compound-I reduziert, bevor ein möglicherweise gebildetes Intermediat durch H_2O_2 reduziert werden kann (vgl. Abb. 1). Deshalb spielt bei Zugabe von NADPH (bzw. in Gegenwart geringer H_2O_2 -Fluxe) Reaktion 2 (Reduktion von Compound-I unter Sauerstofffreisetzung; vgl. Abb. 1) nur noch eine untergeordnete Rolle und der Ferrikatalaseverlust ist äußerst gering. Zur genauen Bestimmung des $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses bzw. des entsprechenden H_2O_2 -Fluxes, ab wann der Katalasezyklus vorherrschend ist, wurde die Ferrikatalaseabnahme bei den oben angegebenen Glucoseoxidaseaktivitäten (\pm NADPH) untersucht und die Ergebnisse in Abb. 21 aufgetragen (hierzu wurden die gewonnenen Ergebnisse der Experimente mit NADPH als Referenz zu den Experimenten ohne Coenzym gesetzt und prozentual aufgetragen).

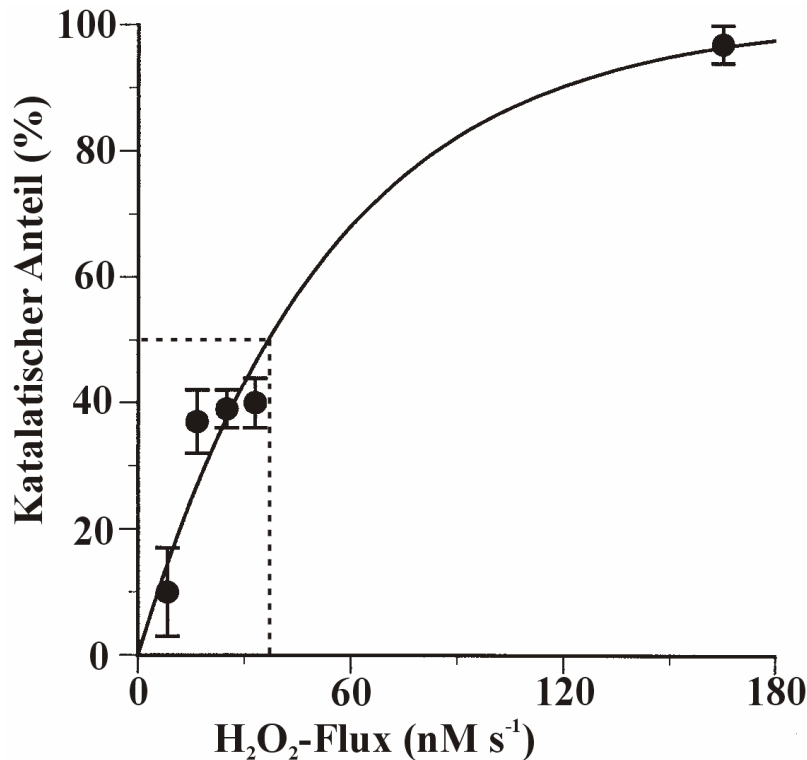


Abb. 21: Bestimmung des Umschaltpunktes zwischen dem Katalase- und dem Dehydrogenasezyklus (Auftragung der Ergebnisse u.a. aus Abb. 20 A/B). Der gestrichelte Bereich (50 % katalatischer Anteil) gibt den Umschaltpunkt zwischen katalatischem (mit O₂-Freisetzung) und dem nicht-katalatischem (ohne O₂-Freisetzung) Bereich an.

Durch Berechnung und Auftragung der Ergebnisse konnte ein Anteil am katalatischen Reaktionszyklus von 8 % (ausschließlich Dehydrogenasezyklus) bei einem H₂O₂-Flux von 8,3 nM s⁻¹ bis hin zu einem Anteil von 98 % (ausschließlich Katalasezyklus) bei einem H₂O₂-Flux von 160 nM s⁻¹ ermittelt werden. Der Umschaltpunkt (zwischen dem katalatischen (+ O₂-Freisetzung) und dem nicht-katalatischen (- O₂-Freisetzung) Zyklus), welcher bei einem Anteil von 50 % erreicht wurde, konnte bei einem H₂O₂-Flux von ca. 40 nM s⁻¹ ermittelt werden (vgl. Abb. 21 schraffierte Linie; umgerechnet entspricht der Wert einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 1,2). Somit liegt das hier erhaltene Ergebnis gut in Übereinstimmung mit dem zuvor mittels Clark-Sauerstoffelektrode gefundenen Verhältnis von 10 min⁻¹ (vgl. Abb. 7) ^[23].

3.12. NADPH-Verbrauch bei niedrigen und hohem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen

Es wurden die $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse 4 min^{-1} und 57 min^{-1} untersucht. Um einen Vergleich zwischen den beiden Verläufen anstellen zu können (unterschiedliche Sauerstoffverbräuche durch verschiedene Glucoseoxidaseaktivitäten), erfolgte die Durchführung der Experimente in einem Schüttelwasserbad (konstante Sauerstoffversorgung; somit konstante H_2O_2 -Fluxe gewährleistet). Für die Bestimmung der NADPH-Konzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie wurden zu den jeweils in Abb. 22 A/B angegeben Zeiten Aliquots der Lösungen entnommen und die NADPH-Abnahme mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt. Die Bestimmung der Konzentration bei einer Wellenlänge von 340 nm (Errechnung der Konzentration erfolgte unter Zuhilfenahme des Extinktionskoeffizienten). Eine Beeinflussung der NADPH-Absorption (bei 340 nm) durch die vorhandene Katalase (2 bzw. 2,1 μM) erscheint plausibel. Jedoch beträgt die Absorption für Ferrikatalase bei 340 nm unter 1 % der von NADPH (vgl. Abb. 8) und kann daher vernachlässigt werden. Die NADPH-Verbräuche sind in Abb. 22 A/B prozentual für das $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis 4 min^{-1} (Glucoseoxidaseaktivität: $8 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$) bzw. 57 min^{-1} (Glucoseoxidaseaktivität: $120 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$) gegen die Zeit und in Abb. 22 B gegen die Konzentration an generiertem H_2O_2 aufgetragen.

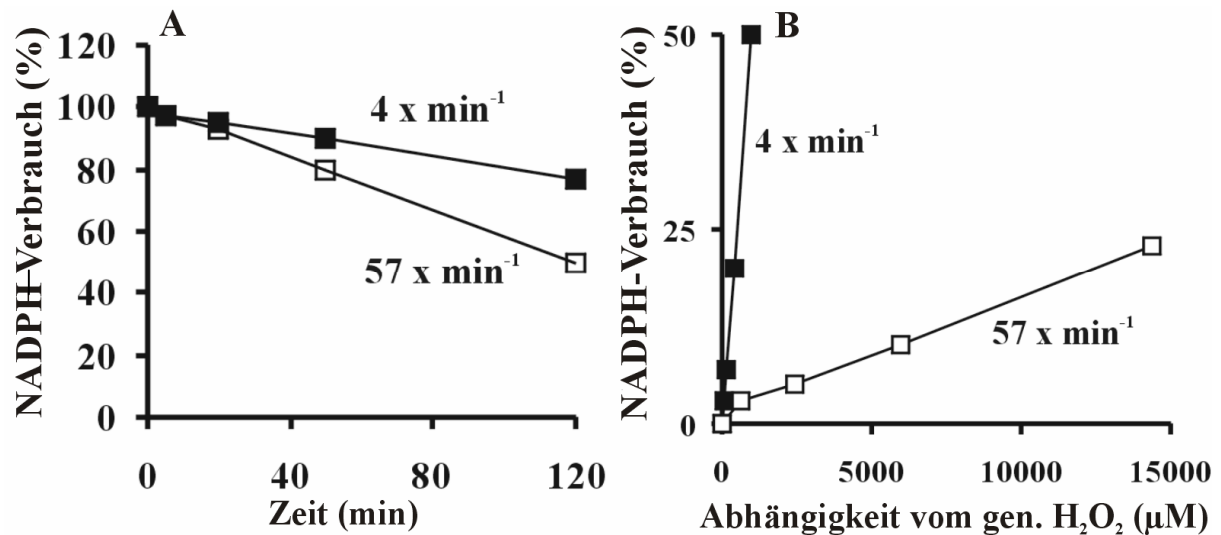


Abb. 22 A/B: NADPH-Verbrauch bei einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 4 min^{-1} bzw. 57 min^{-1} in Abhängigkeit von der Zeit (vgl. Abb. A) bzw. dem NADPH-Verbrauch pro generiertem H_2O_2 (vgl. Abb. B). $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: 2 μM (bei 4 min^{-1}) bzw. 2,1 μM (bei 57 min^{-1}); Aktivität (Glucoseoxidase): 8 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ (4 min^{-1}) bzw. 120 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ (57 min^{-1}); Glucose: 10 mM; NADPH: 160 μM ; DTPA: 100 μM .

Bei beiden $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen zeigten sich jeweils unterschiedliche NADPH-Verbräuche. So betrug der gemessene Verbrauch an NADPH nach einer Reaktionszeit von 120 min bei dem niedrigen Verhältnis von 4 min^{-1} nur etwa 19 %. Dagegen wurde bei einem Verhältnis von 57 min^{-1} wesentlich mehr NADPH abgebaut und nach der gemessenen Reaktionszeit waren hier 49 % der gesamten NADPH Menge verbraucht. Insgesamt wurden bei einer Reaktionszeit von 120 min 960 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ gebildet und 43 $\mu\text{M NADPH}$ abgebaut (4 min^{-1}), was einem Abbauverhältnis $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{NADPH}$ von 22 entspricht. Im Gegensatz dazu wurden bei einem höheren Verhältnis (57 min^{-1}) und einer Reaktionszeit von 120 min insgesamt 14400 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ gebildet sowie 102 μM des Coenzym abgebaut. Dies entspricht einem Abbauverhältnis $\text{H}_2\text{O}_2 / \text{NADPH}$ von 141. Das Experiment liefert somit weitere Hinweise darauf, dass der Reaktionszyklus von Katalase stark von dem jeweiligem H_2O_2 -Flux abhängig ist, da bei einem niedrigem Verhältnis mehr NADPH pro produziertem H_2O_2 verbraucht wird als bei einem höheren. Außerdem gibt der Versuch Hinweise darauf, dass bei niedrigen Verhältnissen in Gegenwart von NADPH die Compound-I-Reduktion durch NADPH erfolgt.

3.13. Beeinflussung des Katalasezyklus-Anteiles am Gesamtreaktionszyklus durch Zugabe unterschiedlicher Additive (Methanol, NADPH) in unterschiedlichen Konzentrationen

Die Durchführung der Versuche erfolgte mittels einer auf 37°C temperierten Clark-Sauerstoffelektrode. Für jedes Experiment wurde ein $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von $2,7 \text{ min}^{-1}$ eingestellt. Dies erfolgte jeweils durch Zugabe von $0,83 \text{ }\mu\text{M}$ Katalase zu einer Glucoseoxidaseaktivität von $37 \text{ nM H}_2\text{O}_2 \text{ s}^{-1}$. Es wurden unterschiedliche Additiv-Konzentrationen (NADPH: $5 \text{ }\mu\text{M}$; Methanol: 5 bzw. 20 mM) eingesetzt. Für die Erstellung der Abbildung 23 wurde der Sauerstoffverbrauch nach Zugabe der Katalase in Bezug zur Aktivität der Glucoseoxidase gesetzt (prozentuale Auftragung; vgl. Experiment 3.1. Abb. 6A/B).

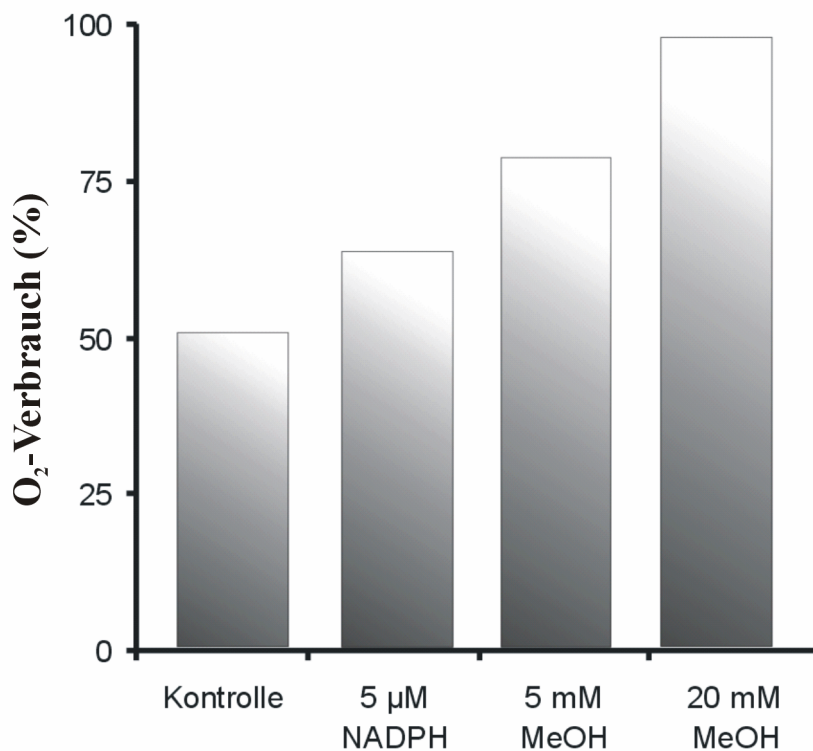


Abb. 23: Beeinflussung des Katalasezyklusses durch Zugabe von unterschiedlichen Additiven und Konzentrationen. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: jeweils $0,83 \text{ }\mu\text{M}$; Aktivität (Glucoseoxidase): 37 nM s^{-1} ($v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse $2,7 \text{ min}^{-1}$); Glucose: 10 mM; Additive: Methanol 5 mM u. 20 mM; NADPH $5 \text{ }\mu\text{M}$; DTPA: 100 μM . Die Bestimmungen der Sauerstoffverbräuche erfolgten, nachdem sich stabile Verläufe eingestellt hatten.

Wie erwartet, betrug der Sauerstoffverbrauch bei der Kontrolle (ohne Zugabe von Additiv) 50 % (vgl. Abb. 23). Nach der Zugabe von 5 μM NADPH (34 % Überschuss zur Hämkonzentration) verringerte sich der Anteil der klassischen Katalasereaktion weiter, so dass der Sauerstoffverbrauch nach der Katalasezugabe auf 63 % gesteigert wurde. Ebenfalls erniedrigte sich der Anteil der sauerstofffreisetzenden Katalasereaktion bei Zuführung von Methanol. Bei einer Zugabe von 5 mM Methanol (1506-facher Überschuss zur Hämkonzentration) verringerte sich der Anteil des Katalasemodus noch weiter. Hierbei betrug der Sauerstoffverbrauch nach Katalasezugabe 78 %. Anhand der Ergebnisse in Abb. 7 wurde bereits deutlich, dass Katalase in Abwesenheit von Wasserstoffdonatoren wie Ethanol und in Gegenwart von NADPH sowohl einen Dehydrogenase- als auch einen Katalasezyklus zur Reduktion des Porphyrin-Eisens nutzen kann (in Abhängigkeit vom $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis ^[23]). Neben NADPH ist auch der Einfluss von niedermolekularen Alkoholen interessant, da auch diese von nicht geringer physiologischer Bedeutung sind (z.B. Abbau von Ethanol in den Leberhepatozyten). Alkohole wie etwa Ethanol sind sogar besonders begünstigt, da diese Substanzen u.a. bei natürlichen Stoffwechselprozessen entstehen können und aufgrund ihrer geringen Molekülgröße direkt bis zum Häm diffundieren, wo sie dann zum Aldehyd (Methanol: Formaldehyd; Ethanol: Ethanal) oxidiert werden. Anhand der Experimente ist davon auszugehen, dass die Additive (alle Zwei-Elektronen-Donatoren) unterschiedlichen Einfluss auf den Katalasezyklus ausüben.

3.14. Stabilität der Katalase gegenüber oxidativen Angriffen. Peroxinitrit als Modellinitiator

Für die Mess-Serie wurde zum einen die Tryptophanfluoreszenz und zum anderen die katalytische Aktivität der Katalase mittels UV/VIS-Spektrophotometrie ($E_{240\text{nm}}$; vgl. Tab. 1) nach Reaktion mit Peroxinitrit (Konzentration zwischen 0 und 2500 μM) betrachtet. Die Tryptophanfluoreszenz bietet sich besonders an, da hierbei oxidative Veränderungen an phenylischen Ringsystemen (wie etwa bei Tryptophan) registriert werden können. Da bei der Bereitstellung von Elektronen („endogenous donor“) sehr wahrscheinlich genau diese Aminosäuren oxidiert werden, ist somit eine quantitative Erfassung des oxidativen Zustandes der Katalase möglich. Die Durchführung erfolgte gemäß Material und Methoden „Fluorimetrische Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz“. Die erhaltenen Ergebnisse beider Messungen wurden

Ergebnisse

in Abbildung 24 prozentual dargestellt und gegen die eingesetzte Peroxinitrit-Konzentration aufgetragen:

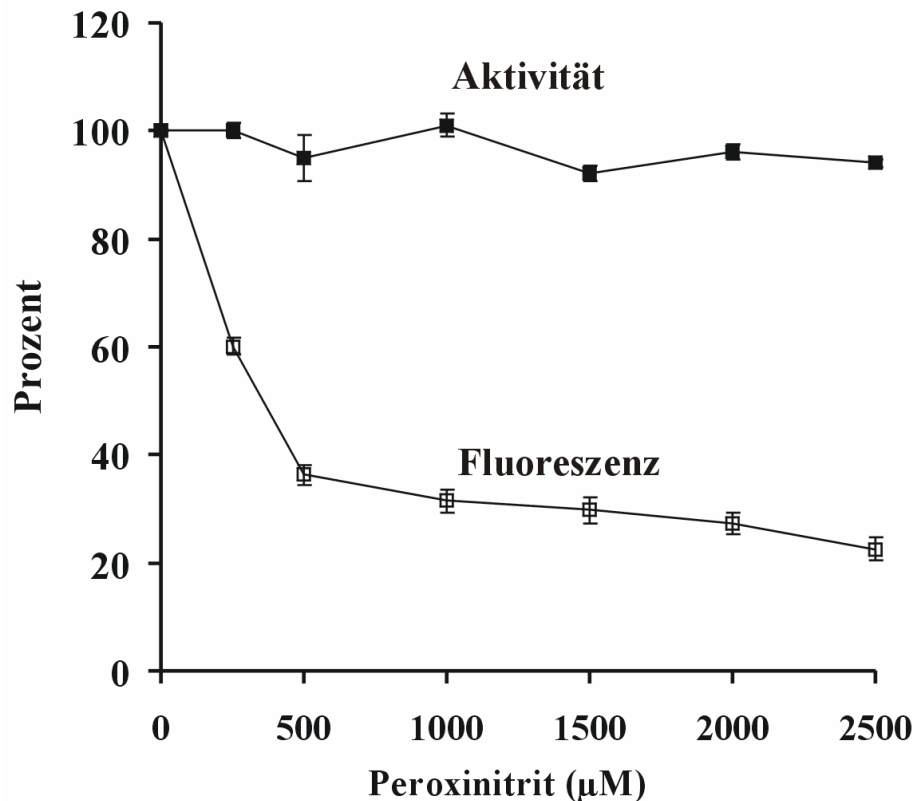


Abb. 24: Abhängigkeit der Tryptophan-Fluoreszenz und der katalytischen Aktivität von Katalase nach der Reaktion mit unterschiedlichen ONOO^- -Konzentrationen. Bestimmung der katalytischen Aktivität durch Zugabe von 10 mM H_2O_2 und Verfolgung des Absorptionsverlustes bei einer Wellenlänge von 240 nm. Tryptophan-Fluoreszenz durch Messung der Extinktion/Emission bei einer Wellenlänge von 532/583 nm. $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: 1 μM ; Peroxynitrit: 0 bis 2500 μM ; DTPA: 100 μM .

Wie aus der Abb. 24 ersichtlich, konnte selbst nach Zugabe von 2500 μM Peroxynitrit kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden (Verringerung der Aktivität um lediglich etwa 4-6 %). Parallel dazu, nahm die Fluoreszenz bei einer $\text{Ex}_{532\text{nm}}/\text{Em}_{583\text{nm}}$ deutlich ab und sank nach der maximal zugefügten Peroxynitrit-Konzentration von 2500 μM auf insgesamt etwa 21 % der ursprünglichen Fluoreszenz ab. Zu beachten ist der biphasische Verlauf der Kurve: Bis zu einer Konzentration von 500 μM ONOO^- findet ein Fluoreszenzverlust von ca. 62 % statt. Hingegen verläuft der Fluoreszenzverlust in einem Konzentrationsbereich zwischen 500 μM und 2500 μM ONOO^- wesentlich verlangsamt; d.h. der Fluoreszenzverlust beträgt nur noch ca. 16,9 %. Anhand der Ergebnisse in Abb. 24 konnte durch Messung der Tryptophan-Fluoreszenz ein weiterer Hinweis auf die Existenz einer proteininternen Elektro-

Ergebnisse

nenquelle erhalten werden. Besonders aromatische Aminosäuren wie z.B. Tryptophan, Tyrosin etc. können relativ leicht durch Compound-I oxidiert werden (es entsteht hierbei z.B. Di-Tyrosin). Interessant ist hierbei die Tatsache, dass Rinderleberkatalase mit insgesamt 24 Tryptophanresten (6 pro Untereinheit) ^[94] im Gegensatz zu anderen Proteinen überdurchschnittlich viele Tryptophan-Moleküle enthält. Radikalbildende Oxidanzien, wie das Peroxynitritanion (ONOO^-), reagieren mit Tryptophanresten z.B. zu Nitrotryptophan bzw. Dimer-Produkten, wobei das Fluorophor zerstört wird (Abnahme der Tryptophanfluoreszenz).

4. Diskussion

4.1. Unterschiedliche Reaktionsmöglichkeiten des Enzyms bei unterschiedlichen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen

Die katalatische Reaktion lässt sich nicht allgemein auf die in der Literatur angegebene Reaktion $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ beschränken, was zweifelsfrei im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Bei der Reaktion von Katalase mit H_2O_2 können daher zwei unterschiedliche Reaktionszyklen zum Tragen kommen. Wie sich zeigte, steht der bevorzugte Reaktionsweg des Enzyms (Katalase- bzw. Dehydrogenaszyklus) somit in direkter Abhängigkeit zum vorherrschenden H_2O_2 -Flux. Aus Abb. 7 wird ersichtlich, dass der klassische Katalasezyklus erst bei einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 10 und höher bzw. oberhalb eines Wasserstoffperoxidfluxes von 40 nM s^{-1} (vgl. Abb. 21) zum Tragen kommt. Unterhalb dieses Fluxes findet keine stoichiometrische Sauerstofffreisetzung seitens des Enzyms statt. Der ermittelte Umschaltunkt lag bei einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 1 min^{-1} .

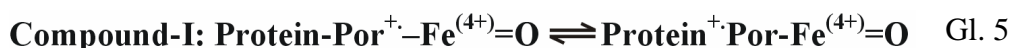
4.2. Verhalten von Katalase unter physiologischen Bedingungen bzw. *in vivo*

Anhand der gefundenen Ergebnisse (vgl. 4.1.) bestehen berechtigte Zweifel, ob der katalatische Zyklus unter Sauerstofffreisetzung überhaupt die vorherrschende Reaktion *in vivo* darstellt. In Erythrozyten findet sich (u.a. aufgrund der Kapazität der Wasserstoffperoxid abbauenden Systeme) ein recht geringes $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis. Wie sich zeigte, hat der klassische sauerstofffreisetzende Katalasezyklus unterhalb eines Ratios von 1–1,2 keinen Einfluss mehr auf die Reaktion. Das vorherrschende $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis liegt *in vivo* unter physiologischen Bedingungen bei etwa 1-7,5 (im humanen Erythrocyten)^[11], was einem H_2O_2 -Flux von $2\text{-}15 \text{ }\mu\text{M min}^{-1}$ bei einer Katalasekonzentration von $2\text{-}3 \text{ }\mu\text{M}$ Enzym entspricht. Dagegen ist das $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis in Hepatozyten noch weitaus niedriger anzusiedeln, da in diesem Zelltyp noch weitaus höhere Katalasekonzentrationen und eine viel größere Menge an H_2O_2 -abbauenden Systemen im Vergleich zu Erythrozyten vorkommen. Die in Leberhepatozyten vorgefundenen H_2O_2 -steady-state-Konzentrationen werden mit hoher Sicherheit unterhalb des von Kirkman für Erythrozyten angegebenen Wertes von $2 - 15 \text{ }\mu\text{M}$

min^{-1} liegen (unter bestimmten Bedingungen wie etwa entzündlichen Veränderungen im Gewebe können diese jedoch weit stärker ansteigen ^[95]). Wird der nicht-katalatische Reaktionszyklus ohne Sauerstofffreisetzung aufgrund eines geringen $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses eingeschlagen, hat das Enzym grundsätzlich zwei Möglichkeiten um das $\text{Fe}^{(4+)}$ -Eisenatom des Häms zu reduzieren: Zum einen können durch Nutzung des „endogenous-donor“ proteininterne Elektronen freigesetzt werden (durch Oxidation von Aminosäuren wie etwa Tryptophan) oder zum anderen können die durch Oxidation freiwerdenden Elektronen von Additiven bzw. zellinternen Substanzen zur Reduktion des Häms genutzt werden. Hierfür können Ein-Elektronen liefernde Substanzen (z.B. Ascorbinsäure) oder auch Zwei-Elektronen liefernde Substanzen (z.B. Ethanol, Methanol, NADPH, NADH etc.) genutzt werden. Fehlen bei der Reduktion von Compound-I aber Zwei-Elektronen-liefernde Additive, führt dies zu einer verstärkten Bildung von Compound-II ^[11,26,33,62,96] (vgl. Experiment 3.9. Abb. 17 (Kontrolle)). Jedoch wird Katalase durch die Oxidation von Aminosäuren einem ständigen Verlust von jeweils einem proteinogenen Elektron pro Zyklus unterworfen. Hierdurch entstehen als Konsequenz irreversible Modifikationen des Aminosäuregerüsts ^[23]. Da Compound-II keine katalytische Aktivität in Bezug auf H_2O_2 besitzt, wurde dieses Intermediat immer als ein „totes Zwischenprodukt“ im Reaktionszyklus von Katalase angesehen. Jedoch legen die Ergebnisse die Vermutung nahe, dass Compound-II mit anderen Augen betrachtet werden muss. Aufgrund der Erkenntnis der geringen H_2O_2 -Konzentrationen *in vivo* wäre die Vermutung, dass Compound-II ein physiologisch relevantes Zwischenprodukt im katalytischen Reaktionszyklus darstellt, nicht ganz abwegig. Hiergegen spricht allerdings die Tatsache, dass die Compound-II-Bildung (bei niedrigen H_2O_2 -Fluxen) effektiv unterdrückt wird (vgl. Abb. 16, 17), sobald NADPH vorhanden ist ^[11,26,32,33,96].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der sauerstofffreisetzende, katalatische Reaktionsmodus nicht bei geringen, physiologisch relevanten H_2O_2 -Fluxen ($<50 \text{ nM s}^{-1}$) in Gegenwart von NADPH stattfindet; d.h. das Coenzym reagiert „direkt“ mit gebildetem Compound-I als Wasserstoffperoxid-Reduktase (vgl. Abb. 20 A) ^[87]. Da in Zellen zwar wenig (etwa $40 \text{ }\mu\text{M}$) NADPH vorhanden ist, dieses aber durch enzymatische Reduktion (z.B. durch die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase) permanent im reduzierten Zustand gehalten wird, ist somit eine ausreichende Versorgung mit NADPH unter physiologischen Bedingungen immer gewährleistet. Der recht geringen NADPH-Konzentration steht jedoch eine enorme Ascorbinsäurekonzentration entgegen. Hieraus ergibt sich ein Problem für die Reaktion *in vivo* (z.B. in Hepatozyten). Um die wasserstoffperoxidzersetzende Wirkung von Katalase aufrecht zu erhalten, darf diese natürlich nicht durch die Ascorbinsäure zu Compound-II umgewandelt wer-

den. Mehr noch, anhand der Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Geschwindigkeitskonstanten (k_{app}) für den Abbau von Compound-I durch Ascorbinsäure bzw. NADPH fast identisch sind (vgl. Experiment 3.7. Abb. 15). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Reaktion von Compound-I mit Ascorbinsäure (Ein-Elektronen-Donator) zu einer drastischen Steigerung der Compound-II-Bildung führte. *In vivo* wären daher alle Katalase-Ressourcen, nicht zuletzt aufgrund der langen Halbwertszeit von Compound-II^[32], katalytisch inaktiviert. Interessanterweise konnte durch die Kombination von Ascorbinsäure und NADPH unter Einstellung ähnlicher Konzentrationsverhältnisse, wie sie auch unter physiologischen Bedingungen herrschen (siehe oben), die Compound-II-Bildung im Gegensatz zu Versuchen welche nur Ascorbinsäure enthielten, drastisch gesenkt werden (vgl. Experiment 3.9. Abb. 17). Für die Erklärung dieses ungewöhnliche Verhalten gibt es zwei Möglichkeiten. Zum einen könnten sich (mindestens) zwei unterschiedliche Intermediate bilden. Hierbei wäre es denkbar, dass das eine Intermediat, welches mit NADPH reagieren kann, im Gegensatz zu dem anderen kinetisch bevorzugt wird. Eine andere und weitaus plausiblere Möglichkeit wäre die Vermutung, dass Compound-I bei der Umwandlung zwischen einer zuerst gebildeten Oxoferryl-Porphyrin- π -Radikalkation-Form und einem sich später ausbildenden, proteinogenen Tyrosylradikal entsteht und somit als eine Übergangsform angesehen werden könnte. Hierbei würde sich folgendes Gleichgewicht einstellen:



So betrachtet stehen zuerst nach Start der Reaktion bzw. der Compound-I-Bildung ausschließlich nur die Oxoferryl-Porphyrin- π -Radikale zur Reaktion mit einem Additiv zur Verfügung (nach 220 ms ersetzen Tyrosyl-Radikalkationen-Intermediate das Oxoferryl-Porphyrin-Radikalkation)^[97]. Anhand der gewonnenen Daten scheint dieses „frühe“ Teilchen ausschließlich zur Oxidation von Zwei-Elektronen liefernden Substanzen wie etwa NADPH befähigt zu sein, da es sonst (in Gegenwart von Ein-Elektronen liefernden Substanzen wie etwa Ascorbinsäure) zu einer Inaktivierung der Katalase durch Compound-II-Bildung kommen würde. Dagegen sollten Ein-Elektronen liefernde Additive (wie z.B. die Ascorbinsäure) zur Reaktion mit dem sich später bildenden Tyrosyl-Radikalkation-Intermediat befähigt sein. Allerdings scheidet eine Oxidation von Ethanol durch Tyrosyl-Radikalkationen aus, da Tyrosyl-Radikalekationen zwar ein relativ starkes Oxidationsvermögen besitzen ($E^\circ(\text{TyrO}^\cdot) = 900 \text{ mV}$), jedoch dieses für Ethanol nicht reicht. Alternativ können Ein-Elektronen liefernde Moleküle wie etwa Dihydrorhodamin-123 bzw. Ascorbinsäure mittels Tyrosyl-Radikalkationen

müheless oxidiert werden. Nach Einstellung des Gleichgewichtes können dann sowohl Ein- als auch Zwei-Elektronen liefernde Additive oxidiert werden (beide Radikale stehen zur Verfügung). Dies ist auch der Grund, warum in Abb. 15 Ascorbinsäure (Ein-Elektronen-Donatoren) durch Katalase oxidiert wird, da sich hier nach der „langen“ Vorlaufzeit von 15 s (=15000 ms) bereits das vermutete Gleichgewicht zwischen dem Oxoferryl-Porphyrin- π -Radikalkation und dem Tyrosyl-Radikalkation eingependelt haben sollte (falls dem so ist und genug oxidierende Tyrosyl-Radikalkationen zur Verfügung stünden).

Die Tatsache, dass eine Compound-II-Bildung durch Anwesenheit von Zwei-Elektronen-Additiven wie NADPH sowie Ascorbinsäure verhindert werden kann (auch in Anwesenheit von Sauerstoffradikalen; vgl. Abb. 16), wirft ein neues Licht auf die Reaktion von Compound-I mit NADPH. Physiologisch macht dieses Verhalten der Katalase durchaus Sinn, denn hierdurch wird einerseits sichergestellt, dass Katalase (eines der wichtigsten antioxidativen Systeme *in vivo*) ständig im reduzierten, aktiven Zustand gehalten wird. Andererseits wird durch diesen Mechanismus sichergestellt, dass weitere, physiologisch äußerst wichtige Antioxidanzsysteme (wie Ascorbinsäure oder Glutathion ^[92]) nicht durch katalatische Oxidation abgebaut werden und so die verschiedenen antioxidativen Ressourcen der Zelle aufrechterhalten werden können. Das Erreichen der tief im Protein sitzenden Häm-Gruppe ist aufgrund der Größe des NADPH-Moleküls und für viele andere Moleküle (z.B. Ascorbinsäure) unmöglich. Somit ist der direkte Kontakt zwischen Häm und NADPH unmöglich (die Distanz zwischen dem C₄-Atom vom NADPH und dem Oxoferryl-Eisenatom beträgt ca. 13,7 Å für den kürzesten Abstand (C₄ bis zur Vinyl-Gruppe)). Für den Transport der Elektronen scheint das Elektronentunneling eine plausible Möglichkeit zu sein ^[98,99,100], Oxoferryl-Porphyrin- π -Radikale zu reduzieren ^[97]. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Spin-Dichte durch die Delokalisation der π -Elektronen nicht nur am Eisenatom lokalisiert ist, sondern sich über den gesamten Porphyrinring (vgl. Abb. 2) erstreckt. Somit bräuchten die von NADPH stammenden Elektronen nur bis zur Vinyl-Gruppe des Porphyrinringes zu gelangen, um die vorhandene Elektronenlücke am Oxoferryl-Porphyrin- π -Radikalkation des Häms zu schließen. Hierdurch verkürzt sich die notwendige Strecke vom C₄-Atom des NADPH ^[99] bis zum Porphyrinring um 6,3 Å auf insgesamt nur noch 13,7 Å. Dieser Abstand ist zu groß, um Tunnelprozesse für Protonen und Hydrid-Anionen zu erlauben, jedoch könnte die Strecke durch Elektronentunneling überbrückt werden, da bereits die Überbrückung einer Strecke von 14 Å für Redox-Zentren in Proteinen bewiesen wurde ^[101]. Mittlerweile wurde auch der Transfer von Elektronen des Coenzym NADPH zum Porphyrinring beschrieben ^[26,96]. Im konkreten Fall diene

ein aus NADPH freigesetztes Elektron zur Reduzierung eines Ferryleisenatom im Porphyrinring.

4.3. Reaktion von Katalase bei niedrigen H_2O_2 -Fluxen und Stabilität gegenüber oxidativen Angriffen

Sind bei geringen $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnissen keine weiteren Additive vorhanden, die durch das Oxoferryl-Porphyrin- π -Radikalkation bzw. durch ein Tyrosyl-Radikal oxidiert werden können, besteht für das Enzym die Möglichkeit, Elektronen aus der Proteindomäne zu mobilisieren. Compound-I bzw. die sich bildenden Radikale sind aufgrund ihrer Reaktivität durchaus in der Lage, Aminosäuren zu oxidieren ^[98,99]. Allerdings nimmt dabei die Enzymaktivität deutlich stärker ab, als wenn das Enzym bei entsprechend ausreichendem Wasserstoffperoxid-Fluxen im gewohnten, sauerstofffreisetzenden Reaktionszyklus arbeitet (so sank beispielsweise die Enzymaktivität bei einem $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisses von 1 min^{-1} nach einer Reaktionszeit von 120 min um etwa 16 % stärker ab als bei einem $\nu(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis von 10 min^{-1} ; vgl. Experiment 3.4. Abb. 10). Hierdurch verliert das Enzym ständig Elektronen aus der Proteindomäne und wird dadurch immer stärker oxidiert. Trotz Oxidation von Aminosäuren kann die Katalase ihre Aktivität trotzdem relativ lange aufrechterhalten (in der beobachteten Reaktionszeit von 120 min sank die Aktivität nur auf etwa 47 % ab; vgl. Experiment 3.4. Abb.10). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Inaktivierung von Katalase mit Peroxinitrit (vgl. Experiment 3.14. Abb. 24), wobei die Tryptophanfluoreszenz als Indiz für den quantitativen Oxidationsgrad der Aminosäuren eines Proteins dienen kann. Obwohl das ONOO^- -Ion als starkes Oxidanz bekannt ist und sehr starke oxidative Veränderungen an der Proteindomäne verursacht, waren im Experiment nur minimale Aktivitätsverluste erkennbar (vgl. Experiment 3.14. Abb.24). Bei steigender Peroxinitrit-Konzentration mussten bei diesem Experiment immer mehr Elektronen aus der Proteindomäne mobilisiert werden und hierdurch nahm die Tryptophanfluoreszenz immer weiter ab (bei einer Konzentration von 2500 μM waren nur noch 20 % der Ausgangsfluoreszenz evident). Anhand der beschriebenen Beobachtungen konnten somit neue Erkenntnisse für die enorme Regenerierungsfähigkeit der Katalase durch Mobilisierung proteininterner Elektronen gewonnen werden, so dass die von Nicholls und Schonbaum aufgestellte Vermutung interner Elektronenquellen bei Katalase weiter untermauert werden kann ^[4]. Jedoch ist die Nutzung von

Diskussion

notwendigerweise zugefügten Substanzen wie etwa Glucose bzw. Xanthin unwahrscheinlich, kann aber nicht hundertprozentig ausgeschlossen werden (zum einen ist ein Erreichen des Häms aufgrund der Größe unmöglich und andererseits müsste viel zu viel Energie für deren Oxidation aufgebracht werden). Eine Überprüfung wäre nur mittels der Stopped-Flow-Technik möglich, bei der eine Einstellung des H_2O_2 -Fluxes durch eine Pumpe statt eines Enzyms erfolgt. Eine direkte Reaktion mit dem Protein- $\text{Por}^{(4+)}=\text{O}$ ist jedoch aufgrund der Molekülgröße von Glucose bzw. Xanthin völlig ausgeschlossen (vgl. Einleitung Abb. 5). Denkbar wäre höchstens eine Reduktion der oxidierten Aminosäure an der Proteinoberfläche durch entsprechende Oxidation der Zuckermoleküle oder aber durch Elektronentunneling und Leitung der freigewordenen Elektronen zu den entsprechenden oxidierten Aminosäuren ^[23,87].

5. Zusammenfassung

Das Enzym Katalase ist ein wichtiger physiologischer Schlüssel zum Abbau von toxischem H_2O_2 . Es konnte im Rahmen der Dissertation gezeigt werden, dass die üblicherweise angenommene klassische Reaktion des Enzyms, bei der zwei Moleküle H_2O_2 zu insgesamt zwei Molekülen Wasser und einem Molekül Sauerstoff abgebaut werden, nur bei einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis (H_2O_2 -Produktionsrate $[\mu\text{M s}^{-1}]/\text{Katalasekonzentration } [\mu\text{M}]$) oberhalb von etwa 1 min^{-1} zum Tragen kommt (100 % katalatische Reaktion erfolgt erst ab einem $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnis oberhalb von 10 min^{-1}). Unterhalb dieses Verhältnisses kann das Enzym kaum, bzw. ab einem Verhältnis von 1 min^{-1} keinen Sauerstoff mehr aus H_2O_2 produzieren. Das hierbei zur Reduktion der Oxoferryl-Spezies (Compound-I) notwendige Elektron kann u.a. durch die Oxidation von proteinogenen Aminosäuren freigesetzt werden („endogenous donor“). Sind Additive wie etwa NADPH oder niedermolekulare Alkohole (z.B. Ethanol) vorhanden, können auch diese zur Elektronengewinnung und damit zur Reduktion der Oxoferryl-Spezies oxidiert werden. Compound-I stellt ein starkes Oxidanz dar. Es ist jedoch fraglich, ob der klassische katalatische Zyklus der *in vivo* Reaktion des Enzyms entspricht, da die H_2O_2 -Fluxe und damit die entsprechenden $v(\text{H}_2\text{O}_2)/[\text{Katalase}]$ -Verhältnisse in den Zellen bzw. Zellkompartimenten unter physiologischen Bedingungen recht gering sind (in besonders katalasehaltigen Zelltypen wie etwa Erythrozyten oder Hepatozyten herrschen sehr kleine H_2O_2 -Fluxe bei recht hohen Katalasekonzentrationen (2-3 μM Katalase in humanen Erythrozyten)).

Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, dass Katalase in Gegenwart von NADPH und geringen H_2O_2 -Fluxen, welche unterhalb von 50 nM s^{-1} liegen, nicht nach dem katalatischen Reaktionszyklus (wie in Gl. 1 aufgezeigt) reagiert. Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Ascorbinsäure und NADPH auf den katalytischen Zyklus untersucht. Interessanterweise ist die Reaktionsgeschwindigkeit für die Reaktion mit Compound-I bei beiden Additiven nahezu identisch. Unter physiologischen Bedingungen (z.B. in Hepatozyten) ist die Konzentration von Ascorbinsäure aber um etwa 200fach höher als die von NADPH. Da Ascorbinsäure zur Compound-II Bildung führt, läge somit die komplette Katalasemenge *in vivo* als Compound-II vor. Als Konsequenz könnte kein H_2O_2 mehr abgebaut werden, da die Reaktion von Compound-II mit H_2O_2 sehr gering ist. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die simultane Gabe von Ascorbinsäure und NADPH unter physiologischen Bedingungen/Konzentrationen nicht zur Bildung von Compound-II führt. Diese Erkenntnis lässt die Vermutung zu, dass die beiden Additive Ascorbinsäure und NADPH jeweils mit zwei unterschied-

Zusammenfassung

lichen Katalase-Intermediaten reagieren müssen, um so eine Inaktivierung zu vermeiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Bedeutung des NADPH, als Coenzym für Katalase, in der Literatur bisher unterschätzt wurde, weil seine Fähigkeit die ascorbinsäure-vermittelte Compound-II-Bildung komplett zu unterdrücken bisher nicht bekannt war.

Material und Methoden

6.1. Charakterisierung der eingesetzten Katalase, Peroxidase, Glucoseoxidase und Xanthinoxidase

Es wurden sowohl lyophyllisierte Katalasen (Wasserentzug durch sublimieren) als auch Kristallsuspensionen des Enzyms eingesetzt. Ein Großteil der Experimente wurde aufgrund des hohen Reinheitsgrades mit einer Kristallsuspension von Roche durchgeführt.

Tab. 2: Verwendete Rinderleberkatalasen (Angaben des Herstellers)

Hersteller	Produkt-Nr.	Form	Aktivität	Stabilisator
Sigma-Aldrich	C1345	lyophyll.	2000-5000 U mg ⁻¹	-----
Sigma-Aldrich	C9322	lyophyll.	2000-5000 U mg ⁻¹	-----
Roche	10156744	Susp.	65000-100000 U mg ⁻¹	0,03 % ^x

^x Zephirol (Dimethyl-benzyl-dodecyl-ammoniumchlorid)

Beide verwendeten Sigma-Aldrich-Katalasen stammen aus der gleichen Präparation/Quelle; jedoch besteht bei dem Produkt C9322 ein höherer Aufreinigungsgrad. Die Katalase der Firma Roche erwies sich als sehr geeignet, da diese Präparate neben einer hohen Aktivität (ca. 53-mal höher als die Produkte von Sigma) auch einen sehr hohen Reinheitsgrad besitzen. Grundsätzlich wurden alle verwendeten Katalasen vor der Verwendung im Experiment durch Dialyse nochmals aufgereinigt.

Alle anderen eingesetzten Enzyme (Meerrettich-Peroxidase (*Armoracia rusticana*; 38000 U m⁻¹), Glucoseoxidase (*Apergillus niger*; 200 U mg⁻¹) und Xanthinoxidase (aus Kuhmilch; 1 U mg⁻¹)) wurden nicht weiter aufgereinigt und entsprechend der jeweiligen Versuchsdurchführung verdünnt im Experiment eingesetzt.

6.2. Herstellung des verwendeten Puffers und Entfernung von Metallionen

Alle Experimente wurden mit Phosphatpuffer pH=7,0 durchgeführt. Phosphatpuffer zeigt eine hinreichend gute Pufferwirkung im pH-Bereich von pH=5,0 bis pH=8,0. Für die Herstellung wurde ausschließlich hochreines Wasser (voll entsalzt; weitere, anschließende Reinigung über Ionenaustauschersäule) eingesetzt. Die verwendete Ionenstärke des Phosphatpuffers betrug bei allen Experimenten 50 mM. Zur Herstellung des Puffers wurden jeweils 2 l 50 mM K_2HPO_4 (8,71 g/l) und 2 l 50 mM KH_2PO_4 (6,8 g/l) Lösung angesetzt. Die Einstellung des gewünschten pH-Wertes erfolgte durch Titration der 50 mM K_2HPO_4 -Lösung gegen die K_2HPO_4 -Lösung. Obwohl grundsätzlich nur hochreine Phosphatsalze verwendet wurden, konnte eine Kontamination durch Metallionen der Übergangsgruppen nicht sicher ausgeschlossen werden. Daher war eine weitere Aufreinigung unumgänglich. Hierfür bot sich die Inkubation des Puffers mit chelatisierbaren Harzkügelchen (Chelex-100) an. Zur Durchführung wurden 1,5 g der Chelex-100 Harzkügelchen mit 50 ml Puffers überschichtet und nach kurzem Schütteln mindestens 12 Stunden (oder länger) bei Raumtemperatur in einem 50 ml Falcon-Röhrchen inkubiert. Es wurde darauf geachtet, dass das Röhrchen möglichst waagrecht und nicht senkrecht gelagert wurde, um den Harzkügelchen einen möglichst großen Oberflächenkontakt zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurde der Puffer langsam in ein zweites 50 ml Falcon-Röhrchen dekantiert, jedoch ohne dabei die Harzkügelchen aufzuwirbeln. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass hierbei unbedingt ein neues Röhrchen verwendet wurde, da dies ansonst zu einer erneuten Kontamination mit Metallionen führen könnte. Weil das Austauscherharz neben Metallionen außerdem noch Protonen bindet, war eine Nachjustierung des pH-Wertes unumgänglich (der zuvor eingestellte pH-Wert wird um etwa 0,2-0,3 pH-Einheiten in den alkalischen Bereich verschoben). Hierzu wurde eine auf 50 mM justierte und vorher mit Chelex-100 behandelte Phosphorsäure verwendet. Der fertig gestellte Puffer (gechelext bzw. ungechelext) wurde bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert und war, so behandelt, bei Kühlung mehrere Monate lagerfähig. Um ein Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern, erfolgte die Anreicherung mit Glucose bzw. Xanthin (» Substrat für die H_2O_2 produzierende Enzyme) grundsätzlich erst am Versuchstag.

6.3. Lösen von Rinderleberkatalase für anschließende Aufbereitung

Rinderleberkatalase, in Form von Kristallsuspensionen bzw. konzentrierten Lösungen, ist bei 4°C recht gut haltbar. Um einen Befall mit Mikroorganismen zu verhindern, sind käufliche Suspensionen oft mit Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol), Zephirol (Dimethyl-benzyl-dodecyl-ammoniumchlorid) oder auch mit Benzalkoniumchlorid (Gemisch verschiedener quartärer organischer Ammoniumverbindungen mit einer Kohlenstoffkettenlänge von C₈H₁₇ bis C₁₈H₃₇ ^[102]) stabilisiert. Die benutzte Rinderleberkatalase, welche fertig präpariert als Suspension vom Hersteller bezogen worden ist, hatte eine spezifische Aktivität, welche bei 65000 U mg⁻¹ lag (Herstellerangabe). Bevor das Enzym im Experiment eingesetzt wurde bzw. weiter aufgereinigt werden konnte, war eine vollständige Lösung der Katalasekristalle erforderlich. Hierzu wurde die Suspension zuerst vorsichtig umgeschwenkt und anschließend 1:5 mit gecheiletem Phosphatpuffer pH=8,0 versetzt. Die vollständige Lösung erfolgte bei 37°C in einem Wärmebad (ca. 4 min, bis Lösung schlierenfrei war). Nach dem Lösungsvorgang wurde die klare, grünliche Lösung sofort bei 4°C auf Eis gelagert und anschließend weiter aufgereinigt. Die Aktivität des Enzyms wurde nach der Aufreinigung nicht überprüft (eine Inaktivierung ist durch die enorme Stabilität der Katalase und durch das (fast ausschließliche) Arbeiten bei 4°C unwahrscheinlich). Zum Schluss erfolgte eine Charakterisierung der Katalase-Konzentration mittels UV/VIS-Spektroskopie bei 405 nm (Ferrikatalase).

6.4. Aufreinigung von Rinderleberkatalase mittels Gelfiltrationssäule

Im Gegensatz zur Dialyse zeichnet sich die Gelfiltration durch kurze Aufreinigungszeiten aus und eignet sich daher gut, um bei hohen Katalase-Verbräuchen schnell größere Mengen an Enzym aufzureinigen. Als geeignetes Säulenmaterial erwies sich „Sephadex G-50 medium“ der Firma Sigma. Für die Herstellung der Säule wurde zunächst eine geeignete Chromatographiesäule (50 ml Volumen) zu etwa 80 % der Gesamtlänge mit gequollenem Sephadex (in Phosphatpuffer) gefüllt. Wichtig ist hierbei, dass der benutzte Puffer zuvor etwa 15 min entgast wurde, da dies sonst zu einer Ausgasung in der Säule führen kann. Dies erfolgte mittels eines durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugten Vakuums. Als Konsequenz führt dies zu einer starken Verminderung der Aufreinigungsqualität. Um Schädigungen bzw. Aktivitätsverluste der Katalase zu verhindern, wurden alle Schritte in einer Kühlkammer bei 4°C durchge-

führt. Nachdem die Säule befüllt worden war und sich das Sephadex abgesetzt hatte, wurde die Chromatographiesäule mehrfach mit Phosphatpuffer (entgast; vgl. oben) gespült. Es wurde drauf geachtet, dass das Säulenmaterial immer mit Puffer bedeckt war. Bevor die gelöste Katalase auf die Säule aufgetragen wurde, wurde die Lösung kurz (etwa 30-60 s) mittels Eppendorf-Tischzentrifuge bei 5000 rpm zentrifugiert, um mögliche Präzipitate zu sedimentieren. Anschließend wurde der Flüssigkeitsstand der Chromatographiesäule bis kurz über das Harz (etwa 2-3 mm) abgelassen und im Anschluss daran die Katalase vorsichtig auf die Säule aufgetragen. Nachdem die Proteinlösung vollständig in das Chromatographieharz eingedrungen war, wurde erneut mit Phosphatpuffer (entgast) aufgefüllt und das Durchwandern der grünlichen Katalaselösung durch die Säule optisch verfolgt. Kurz bevor die dunkelgrüne Katalaseschicht die Säule verlassen hatte, wurde mit dem Aufsammeln von Fraktionen begonnen (jeweils 5 Tropfen pro Fraktion). Es wurden solange Fraktionen gesammelt, bis die grünliche Farbe vollständig aus der Säule verschwunden war.

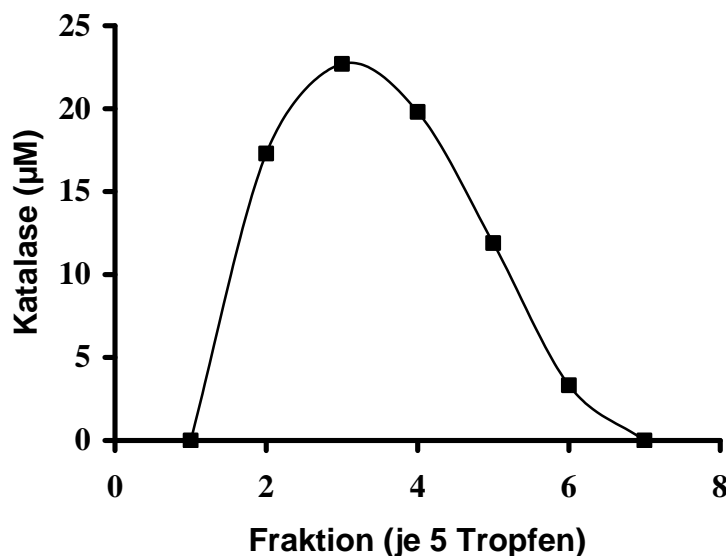


Abb. 25: Elutionsprofil der Gelfiltrationsaufreinigung von Katalase (Beispiel). K_2HPO_4 - KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH= 7,0; 4°C); DTPA: 100 µM.

Die Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Fraktionen erfolgten mittels UV-VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 405 nm (Ferrikatalase) und die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels des Extinktionskoeffizienten. Für die anschließende Verwendung im Experiment wurden nur Fraktionen mit hoher Enzymkonzentration benutzt (z.B. Fraktion 3 Abb. 25). Fraktionen mit annähernd gleich hohen Konzentrationen wurden gepoolt (z.B. Fraktionen 2+4; vgl. Abb. 25). Wurden diese gepoolt, so war die Konzentration erneut

zu bestimmen. Die aufgereinigte Katalaselösung wurde anschließend bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

6.5. Aufreinigung von Katalaselösung mittels 100 kDa „Microcons“

Die Aufreinigung von Katalase mittels 100 kDa „Microcons“ (Firma Amicon) ist neben der Gelfiltration eine weitere, mögliche Technik zur Aufreinigung des Enzyms. Im Gegensatz zur Gelfiltrationschromatographie erfolgt die Trennung der einzelnen Substanzen durch Zentrifugation durch ein Molekularsieb, dessen Poren nur Moleküle unter einer Masse von 100 kDa passieren lassen. Größere Moleküle können nicht durch das Sieb gelangen und werden im Überstand zurückgehalten. Ein weiterer Vorteil dieser Technik ist die vollständige Entfernung von Katalase-Monomeren, da diese bei einem Molekulargewicht von etwa 66 kDa ausnahmslos durch das Molekularsieb gelangen und im Durchfluss eluieren. Ein großer Nachteil dieser Methode ist jedoch die Verstopfung des Molekularsiebes durch ausgefallenes Protein (Überschreitung des Löslichkeitsproduktes). Durch Erhöhung des pH-Wertes des Waschphosphatpuffers auf pH=8,0 statt pH=7,0 konnte das Problem jedoch umgangen werden. Zur Durchführung mussten zuerst die kristalline Katalasesuspension aufgelöst (vgl. Punkt 6.2.) werden. Anschließend wurden zwei „Microcon“ Gefäßchen mit jeweils 500 µl Katalaselösung befüllt und anschließend 12 min bei 10500 rpm zentrifugiert, bis sich der Flüssigkeitsstand kurz über dem Sieb befand. Anschließend wurden erneut 250 µl Phosphatpuffer in jedes Gefäß pipettiert und mit der konzentrierten Proteinlösung durch vorsichtiges Auf- und Abziehen (Scherkräfte!) der Lösung mit einer kleinen Pipette gut vermischt. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (ca. 12 min bei 10500 rpm). Insgesamt wurden so pro Aufreinigungsvorgang 2 - 3 Zentrifugationsschritte durchgeführt. Zur Anpassung des pH-Wertes der Lösung wurde beim letzten Zentrifugationsschritt Phosphatpuffer pH=7,0 anstelle pH=8,0 verwendet (durch Verringerung der Zentrifugationszeit des letzten Zentrifugationsschrittes konnte so eine Ausfällung der Katalase verhindert werden). Nach der Aufreinigung konnte die konzentrierte Proteinlösung vorsichtig mit einer kleinen (z.B. 100 µl) Pipette aus dem Überstand entnommen und in ein geeignetes Gefäß überführt werden. Besondere Aufmerksamkeit galt möglichen Präzipitaten, welche sich bei der Aufkonzentrierung in dem Microcon-Röhrchen gebildet haben können. Aus diesem Grunde wurde generell die aufgereinigte Katalaselösung vor der Konzentrationsbestimmung kurz zentrifugiert. Die Bestimmung der Ab-

sorption in der Lösung erfolgte anschließend mittels UV/VIS-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von 405 nm (Ferrikatalase); die Berechnung der Konzentration erfolgte mittels Extinktionskoeffizienten (s.o.). Bis zum Verbrauch im Experiment wurde das Enzym auf Eis bzw. im Kühlschrank gelagert.

6.6. Dialyse von Rinderleberkatalase

Vor Beginn der Dialyse wurde zuerst ein Stück getrockneter Dialyseschlauch entsprechender Länge von der Rolle abgeschnitten und dieser etwa 5 min in aq. dest. gequollen. Das so behandelte Stück wurde anschließend vorsichtig mit etwas Zellstoff abgeputzt, um anhaftendes Wasser möglichst komplett zu entfernen. Anschließend wurde ein Ende des Schlauches durch einen Knoten verschlossen. In das andere, offene Schlauchende erfolgte nun die Applikation der aufbereiteten Katalaselösung (z.B. mit Hilfe einer 1000 µl Eppendorf-Pipette). Im Anschluss daran wurde das noch offene Ende des Dialyseschlauches mit einem Knoten verschlossen. Beim Zuknoten der Enden wurde besonders darauf geachtet, dass das Zuziehen des Knotens von Schlauchende her erfolgte und nicht umgekehrt (ggf. Beschädigung bzw. Dehnung der Membran). Jetzt wurde der überstehende Dialyseschlauch bis kurz vor dem Knoten abgeschnitten und der gefüllte Schlauch gründlich mit aq. dest. von anhaftenden Proteinresten befreit. Nun konnte die Dialyse beginnen. Hierzu wurde der gefüllte Dialyseschlauch in ein Bechergefäß überführt, welches mit etwa 1 l vorgekühltem Phosphatpuffer (4°C; pH=7.0) gefüllt worden war. Der eigentliche Dialysevorgang erfolgte in einem gekühlten Raum bei etwa 4 - 6°C. Zur Erhöhung der Diffusionsleistung wurde die Lösung mit Hilfe eines Magnetrührers langsam gerührt. Mittels Pufferwechsels konnte die Dialyseleistung noch weiter gesteigert werden. Hierzu wurde der Phosphatpuffer nach etwa 1-2 Stunden gegen neuen, vorgekühlten Puffer (ca. 3,5 l) ausgewechselt (die Puffermenge bezog sich auf eine Katalasemenge von 2 ml mit einer Konzentration von etwa 15 – 20 µM). Im Anschluss folgte die zweite, etwa 22 h dauernde Dialyse. Nach Abschluss der Dialysevorgänge wurde der Schlauch aus der Pufferlösung entnommen, erneut mit aq.dest. abgespült und mit Zellstoff abgetrocknet. Zur Entnahme der Katalaselösung wurde anschließend ein Ende des Dialyseschlauches kurz hinter dem Knoten abgeschnitten und die Proteinlösung in einem entsprechenden Gefäß (z.B. Eppendorf- bzw. Falcongefäß) aufgefangen. Auch hier erfolgt die Lagerung bis zur Verwendung im Experiment auf Eis bzw. im Kühlschrank. Das aufgereinigte Enzym wurde noch am Versuchstag aufgebraucht bzw. die Reste wurden verworfen.

6.7. Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in Lösungen mit Hilfe einer Clark-Sauerstoffelektrode

Die Bestimmung der Sauerstoffkonzentration mittels Clark-Sauerstoffelektrode beruht auf der polarographischen Messung des Sauerstoffpartialdruckes in Lösungen. Die Technik wurde in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts entwickelt. Das hierbei gemessene elektrische Potential hängt vom gelösten Sauerstoff ab; die gelöste Konzentration wiederum vom Partialdruck des Gases. Den Zusammenhang hierfür liefert das Henrysche Gesetz:

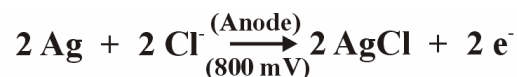
$$X_a = \frac{P_a}{H_{a,L}(T)} \quad \text{Gl. 6}$$

X_a = Molanteil des gelösten Gases

P_a = Partialdruck über der Lösung

H = Henry-Konstante (temperaturabhängig)

Je nach pH-Wert ergibt sich eine I-U-Kurve mit ausgeprägtem Plateau bei einer äußeren Polarisationsspannung zwischen ~500 und ~900 mV (bei den üblichen basischen Elektrolyten sind ~700 bis ~900 mV erforderlich). Die benutzte Messzelle besteht aus einer Kathoden- (Platin) und einer Anodenhalbzelle (Silber). Durch Anlegen einer Gleichspannung von etwa 800 mV erfolgt eine Polarisierung. Der gelöste Sauerstoff wird dabei an der Kathode reduziert. Pro Molekül Sauerstoff werden 4 Elektronen frei. Hierbei fließt ein Strom, welcher von einem Amperemeter gemessen werden kann. Der Strom steht somit im direkten Verhältnis zur vorhandenen Sauerstoffkonzentration. An den Elektroden der Apparatur finden folgende Reaktionen statt (Gl. 7):



Allgemein ist die elektrochemische Sauerstoffbestimmung in einem Konzentrationsbereich zwischen 5 und 500 $\mu\text{mol l}^{-1}$ Sauerstoff einsetzbar, wobei Abb. 26 den Zusammenhang zwischen der Sauerstoffsättigung und der Temperatur wiedergibt.

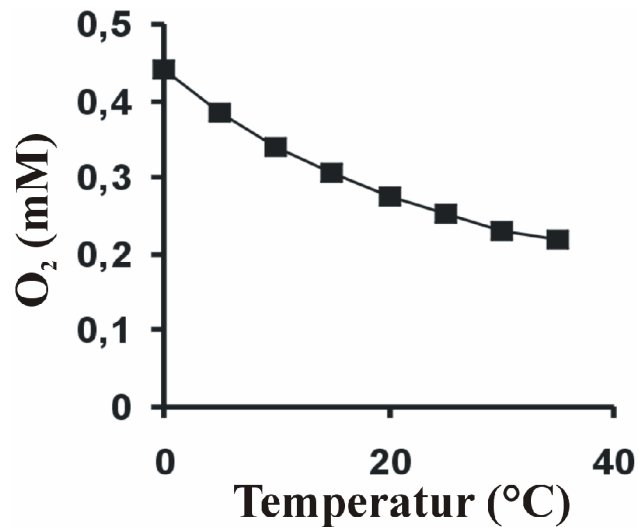


Abb. 26: Zusammenhang zwischen Sauerstoffsättigung und Temperatur von Wasser ^[103].

Grundsätzlich erfolgten alle Messungen bei 37°C. Zum Aufbau der Clark-Elektrode wurde zuerst die Platin-Elektrode (Kathode) mit einem Tropfen 3 M Kaliumchlorid-Lösung angefeuchtet. Auf die Kathode wurde im Anschluss ein kleines Stückchen Zigarettenpapier gebracht und auch dieses mit einem weiteren Tropfen 3 M Kaliumchloridlösung befeuchtet. Nachdem ein (möglichst den ganzen Kathodensockel bedeckendes) Stück Teflonfolie blasenfrei auf die Kathode gelegt wurde, wurde dieses durch einen Gummi-O-Ring fixiert. Anschließend wurde dann das umgebende Reservoir vollständig mit der 3 M Kaliumchloridlösung gefüllt. Nach dem Aufschrauben des Heizmantels und dem Anschluss an den Detektor war der Aufbau abgeschlossen und die Elektrode konnte kalibriert werden. Hierzu wurde zunächst die Reaktionskammer mit aq. dest. gespült und etwa 10 - 15 Minuten stehen gelassen. Dabei ist die am Detektor angezeigte Spannung zu beobachten. Sobald sich eine Spannung von unter 800 mV eingestellt hatte, konnte die eigentliche Eichung beginnen. Zur Eichlösung wurde eine 10 mM H₂O₂-Lösung bereitet. Anschließend wurde die Reaktionskammer der Clarkelektrode mit 1000 μl Phosphatpuffer pH=7,0 gefüllt. Um unerwünschtes Ausgasen zu verhindern, war der verwendete Puffer grundsätzlich auf 37°C vorgewärmt (vgl. Abb. 26). Nachdem sich am Schreiber eine stabile Grundlinie eingestellt hatte, konnte die Zugabe von etwa 2 μl Katalaselösung (Stammlösung) sowie einer genau bestimmten Menge der H₂O₂-Maßlösung erfolgen. Hierbei fiel zuerst ein steiler Anstieg der Detektornadel auf, da die Sauerstoffkonzentration aufgrund des Wasserstoffperoxidabbaues durch die Katalase rapide ansteigt. Nach der Ausbildung eines Plateaus erfolgte die Zugabe einer genau definierten Menge

an H_2O_2 -Eichlösung. Insgesamt erwies sich die H_2O_2 -Zugabe in vier Schritten 25, 50, 75 und 100 μM (entspricht z.B. 2,5, 5,0, 7,5 und 10 μl Eichlösung) als sinnvoll. Die Auswertung der Kalibriermessung, als auch der eigentlichen Messung, erfolgte durch manuelles Abmessen des Schreiberanstieges.

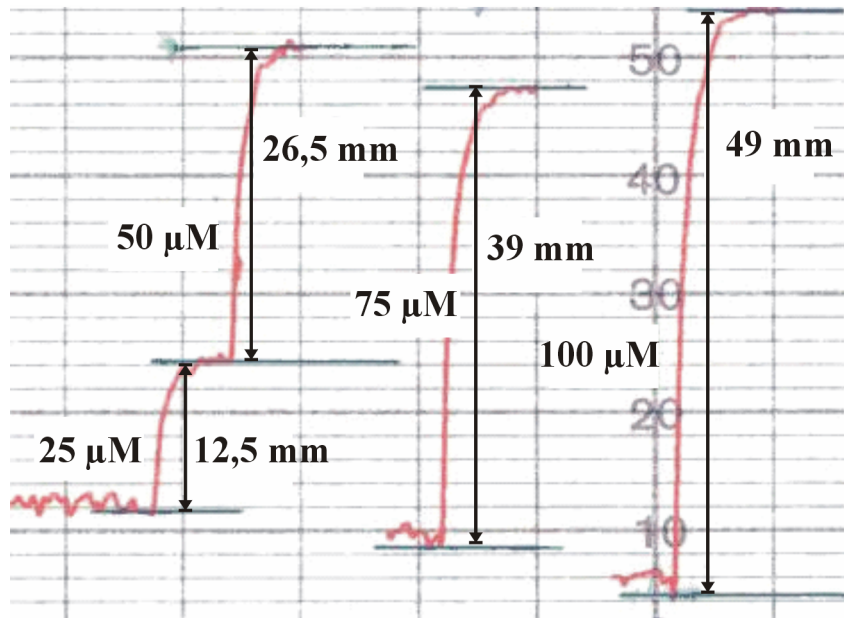


Abb. 27: Eichung der Clark-Sauerstoffelektrode (vergrößerte Originalregistrierung).
 $\text{K}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: 2 μl Stammlösung (Herstellerfläschchen); H_2O_2 : 25, 50, 75 und 100 μM ; DTPA: 100 μM .

Nach Abschluss der Kalibriermessung bzw. des jeweiligen Experimentes wurde die Kammer der Clarkelektrode gründlich mit aq. dest. gespült und anschließend durch Zugabe von 1000 μl vorgewärmten Puffer erneut gefüllt. Die Waschprozedur wurde auch dann wiederholt, wenn es nach Zugabe von geringer Menge H_2O_2 zu einem Anstieg der Sauerstoffkonzentration kam (» Katalasereste).

6.8. Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration mittels Amplex-Red

Eine der exaktesten Bestimmungsmöglichkeit für H_2O_2 ist die Messung mittels eines Fluoreszenzfarbstoffes wie etwa Amplex-Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin) ^[23]. Die Technik beruht auf dem Abbau von H_2O_2 mit Hilfe von Meerrettich-Peroxidase. Da die Pero-

xidase einen Elektronendonator benötigt, kann Amplex-Red hier als notwendiger Donor fungieren (vgl. Abb. 28).

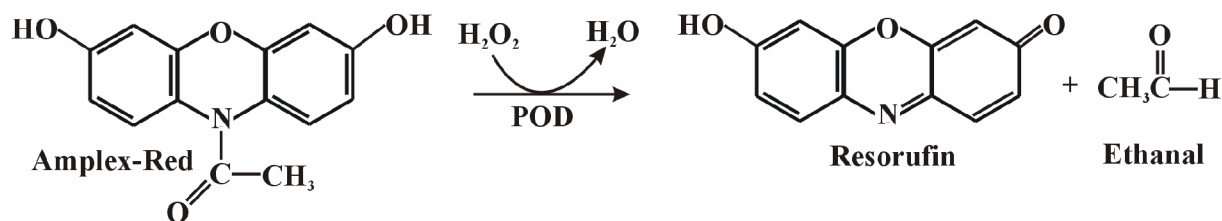


Abb. 28: Reaktionsschema des katalytischen Abbaues des Fluoreszenzfarbstoffes Amplex-Red mit H_2O_2 zu Resorufin und Ethanal ^[104]. Als Katalysator der Reaktion dient Meerrettich-Peroxidase. H_2O_2 dient bei der Reaktion als Wasserstoffdonor.

Das dabei entstehende Produkt (Resorufin) fluoresziert im Gegensatz zum Edukt, wobei die größte Extinktion bei einer Wellenlänge von 532 nm liegt (höchste Emission bei einer Wellenlänge von 583 nm). Die Reaktion findet stöchiometrisch (1:1) statt, d.h. pro abgebautem H_2O_2 Molekül wird ein Molekül Amplex-Red oxidiert, was bei der Reaktion zu einem Molekül Resorufin umgewandelt wird.

Bei den durchgeführten Experimenten wurde zuerst eine 1 mM Amplex-Red-Stammlösung hergestellt. Als Lösungsmittel diente hochreines Dimethylsulfoxid, welches vorher etwa 10-15 Minuten mit Stickstoff begast wurde. Nach der Bereitung der Stammlösung wurde diese zunächst in geeignete Mengen (z.B. 50 μl) portioniert und im Anschluss daran sofort bei -20°C eingefroren (Lagerung bis zum Verbrauch im Gefrierschrank). Alle aufgetauten bzw. angefangenen Portionen wurden aufgrund der Autoxidationsneigung des Amplex-Reds möglichst schnell verbraucht. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Zur Kalibrierung wurden 1900 μl Puffer, 2 μl Amplex-Red und 10 μl Peroxidase (3800 U ml^{-1}) in eine Küvette gegeben und die Fluoreszenz bei 532 / 583 nm in einem Fluoreszenzphotometer gemessen. Die so erhaltene Fluoreszenz wurde notiert. Als nächstes erfolgte die eigentliche Kalibrierung durch Zugabe von 4 μl einer 5 μM Resorufin-Lösung. Auch hiervon wurde zunächst eine 1 mM Stammlösung mit stickstoffbegastem Dimethylsulfoxid angesetzt und diese dann (portioniert) bei -20°C gelagert (vgl. Herstellung der Amplex-Red Stammlösung). Vor dem Gebrauch erfolgte eine 1:200 Verdünnung der Stammlösung mit Phosphatpuffer pH=7,0 (Konzentration entspricht dann 5 μM). Von der Resorufin-Verdünnung wurden anschließend 4 μl in die Fluoreszenzküvette pipettiert, so dass die Endkonzentration 10 nM betrug. Dann erfolgte eine erneute Messung der Fluoreszenz. Aus der Differenz der beiden Fluoreszenzwerte vor und nach Resorufin-Zugabe konnte anschließend der Referenzwert für 10 nM H_2O_2 ermittelt werden. Nach Abschluss der Kalibrierung wurden anschließend 100 μl der unbe-

kannten Probe zugegeben und die Fluoreszenz durch erneutes Messen ermittelt. Eine Reaktionszeit von einer Minute für die Peroxidasereaktion (bei Raumtemperatur) erwies sich hierfür als ausreichend. Unter Berücksichtigung der Verdünnung der Probe konnte so anschließend die H_2O_2 -Konzentration der unbekannten Probe ermittelt werden.

6.9. Fluorimetrische Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz

Die Tryptophanfluoreszenz kann brauchbare Hinweise auf den Oxidationsgrad der Aminosäuren eines Proteins liefern. Bei dieser Methode wird die Tatsache ausgenutzt, dass die delokalisierten π -Elektronen des Tryptophans bei Anregung fluoreszieren.

Die Bestimmung der Tryptophanfluoreszenz erfolgte unter Zuhilfenahme einer Küvette in einem Fluoreszenzphotometer. Die Bestimmung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Extinktion von 275 nm sowie einer Emission bei 314 nm. Um Fehlmessungen durch eine zu hohe Fluoreszenz zu vermeiden, wurde das Katalase-Oxidantengemisch für die Messung entsprechend verdünnt. Für eine 1 μM Katalaselösung wurde ein Verdünnungsfaktor 1:20 gewählt. Zur Durchführung wurde zunächst eine Inkubationsreihe erstellt und als Referenz die Fluoreszenz vor Zugabe der zu testenden Substanz gemessen. Hierzu wurden 1900 μl Phosphatpuffer mit 100 μl des Ansatzes im Fluoreszenzphotometer vermessen. Anschließend wurde der Versuch durch Zugabe der jeweiligen Menge an Oxidanz zum Katalaseansatz gestartet (der Volumenverlust durch die Referenzmessung floss mit in die Berechnung mit ein). Nach erfolgter Inkubation (1 min) wurden die Proben erneut bei 275 / 314 nm im Fluoreszenzphotometer vermessen (gleicher Verdünnungsfaktor). Durch Bestimmung der Differenz aus der Referenz und des Inkubationsansatzes (unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors) konnte so der Verlust an Fluoreszenz bestimmt werden.

6.10. Bestimmung der Katalase-Aktivität mittels UV/VIS-Spektroskopie

Die Bestimmung der Katalaseaktivität erfolgte mittels UV/VIS-Spektroskopie ^[70]. Der Test eignet sich im Gegensatz zu anderen Methoden (vgl. auch Tab. 1) besonders gut für wässrige Lösungen, da bei den durchgeführten Experimenten keine störenden Faktoren wie etwa Blut

bzw. Gewebezellen eine Rolle spielten. Aufgrund der hohen Geschwindigkeitskonstante, die die Katalasereaktion besitzt (für Gl. 1: $k=0,6 \cdot 10^6 \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bzw. für Gl 2: $k=1,8 \cdot 10^7 \text{ mol l}^{-1} \text{ s}^{-1}$) ist eine Verdünnung des Katalaseansatzes unumgänglich. Dies ist auch deshalb notwendig, da das Enzym aufgrund der hohen H_2O_2 -Konzentrationen ausschließlich im katalatischen Zyklus arbeitet. Dadurch wird molekularer Sauerstoff freigesetzt, welcher bei zu hoher Katalaseaktivität in so hohen Konzentrationen entsteht, dass das Löslichkeitsprodukt überschritten wird wodurch es nicht mehr möglich ist den H_2O_2 -Restgehalt UV-VIS-Spektroskopisch zu quantifizieren. Als geeignete Konzentration erwiesen sich Katalasekonzentrationen von 0,1 – 1 nM. Alle Aktivitätsmessungen wurden bei einer Temperatur von 37°C mit 50 mM Phosphatpuffer (pH=7,0) durchgeführt. Zur Verhinderung von unerwünschtem H_2O_2 -Abbau durch eventuell vorhandene Spuren von Metallionen, wurde grundsätzlich 100 μM DTPA zugefügt; außerdem wurde der verwendete Puffer auf 37°C vorgewärmt. Zur Durchführung der Messung wurde zunächst eine Küvette mit Phosphatpuffer gefüllt und anschließend H_2O_2 zugegeben (Endkonzentration 10 mM). Danach wurde die entsprechend verdünnte Katalaselösung zugefügt und durch Auf- und Abziehen mit einer geeigneten Pipette (z.B. 100 μl) vermischt. Umgehend nach der Durchmischung erfolgte die Messung der Absorption im UV-Bereich bei einer Wellenlänge von 240 nm^[3]. Für alle Messungen hatte sich eine Gesamtmesszeit von 5 min als ausreichend (Messung erfolgt alle 15 s) erwiesen. Die Durchführung der Messungen erfolgte in einem PC-gesteuerten UV/VIS-Spektrometer. In Abb. 29 wurde exemplarisch eine photometrische Messung der Katalaseaktivität dargestellt.

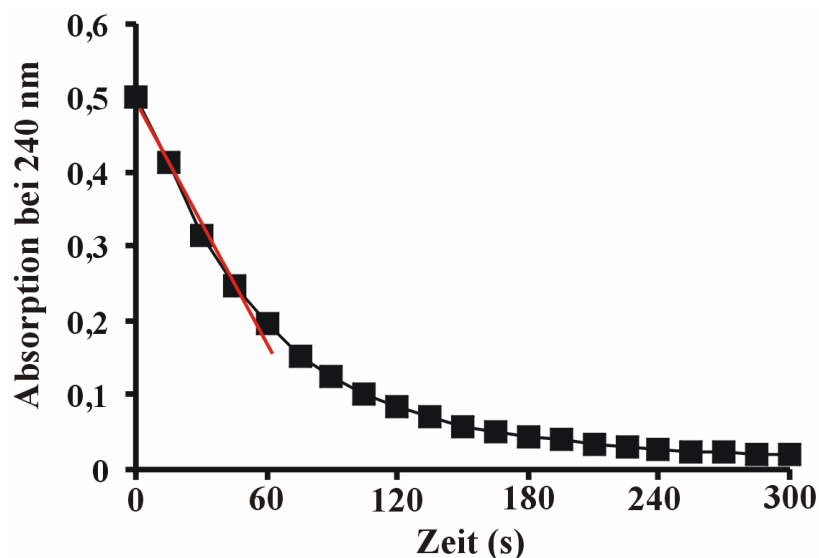


Abb. 29: Abbau von 10 μM Wasserstoffperoxid mit 1 nM Katalase (exemplarisch).
 Abnahme H_2O_2 : $\Delta_{\text{E}240\text{nm}}=0,00468 \text{ s}^{-1}$. KH_2PO_4 -Puffer (50 mM; pH=7,0; 37°C); Katalase: 1 nM; H_2O_2 : 10 mM; DTPA: 100 μM .

Material und Methoden

Wie aus Abb. 29 ersichtlich, ist nur der erste Bereich (bis etwa 60 s; vgl. rot eingezeichnete Gerade) annähernd linear und es wurde nur dieser für die Messung herangezogen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Willekens H.**, Inzé D., van Montagu M., van Camp W. (1995): Catalases in plants. *Mol. Breeding* **1**, 207-228
- [2] **Antunes F.**; Cadenas, E. (2000): Estimation of H₂O₂ gradients across biomembranes. *FEBS Lett.*, **475**, 121-126
- [3] **Aebi H.**, in Bergmeyer U. (1970): *Enzymatische Methoden*. Bd. 1, Verlag Chemie, Weinheim, 636
- [4] **Nicholls P.**, Schonbaum G. R., in Boyer P. D. (1963): *The Enzymes*. Vol. 8, Academic Press, New York, 147-225
- [5] **Sumner J. B.**, Dounce A. L. (1937): Crystalline catalase. *J. Biol. Chem.* **121**, 417 - 424
- [6] **Loewen P.**, Scandalios J. (Hg) (1997), in: *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 272-308
- [7] **Ruis H.**, Koller F., in Scandalios J. (Hg) (1997): *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defence*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 309-342
- [8] **Switala J.**, Loewen P. (2002): Diversity of properties among catalases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **401**, 145-154
- [9] **Chelikani P.**, Fita I., Loewen P. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 192-208
- [10] **Jakopitsch G.**, Auer M., Regelsberger G., Jantschko W., Furtmüller P., Rüter F., Obinger C. (2003): Distal site aspartate is essential in the catalase activity of catalase-peroxidases. *Biochemistry* **42**, 5292-5300
- [11] **Kirkman H. N.**, Rolfos M., Ferraris A. M., Gaetani G. F. (1999): Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* **274**, 13908-13914
- [12] **Aebi H.** in U. Bergmeyer U. (1983): *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol. III, Verlag Chemie, Weinheim, 272
- [13] **Schroeder W. A.**, Shelton I. R., Shelton J. B., Robberson B., Appell G., Fang R. S., Bonaventura J. (1982): The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **214**, 397

- [14] **Vainshtein B. K.**, Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. J. (1985): Spatial organization of catalase proteins. Proc. Int. Symp. Biomol. Struct. Interactions, Suppl. J. Biosci **8**, 471-479
- [15] **Frew J. E.**, Jones P. (1984): Structure and functional properties of peroxidases and catalases Adv. Inorg. Bioinorg. Mech. **3**, 175-212
- [16] **Nicholls P.**, Fita I., Loewen P. (2001): Enzymology and structure of catalases. Adv. Inorg. Chem. **51**, 51-106
- [17] **Chance B.** (1947): An intermediate compound in the catalase-hydrogen peroxide reaction. Acta Chem. Scand. **1**, 236-267
- [18] **Chance B.** (1948): The enzyme-substrate compounds of catalase and peroxides. Nature **161**, 914-917
- [19] **Chance B.** (1949): The composition of catalase-peroxide complexes. J. Biol. Chem. **179**, 1311-1330
- [20] **Deisseroth A.**, Dounce A. (1970): Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. Physiol Rev. **50**, 319-375
- [21] **Sichak S.**, Dounce A. (1986): Analysis of the peroxidatic mode of action of catalase. Arch Biochem Biophys. **249**, 285-295
- [22] **Scandalios J.** (1994), Foyer C. & Molineaux P. (Hg) in: Causes of phototooxidative stress and amelioration of defence systems in plants. 275-315
- [23] **de Groot H.**, Auferkamp O., Bramey T., de Groot K., Kirsch M., Korth H. G., F. Petrat F., Sustmann R. (2005): Non-oxygen-forming pathways of hydrogen peroxide degradation by bovine liver catalase at low hydrogen peroxide fluxes. Free Radic. Res. **40**, 67-74
- [24] **Murthy M. R. N.**, Reid III T. J., Sicignano A., Tanaka N., Rossmann M. G. (1981): Structure of beef liver catalase. J. Biol. Chem. **152**(2), 465-499
- [25] **Poulos T. L.**, in G. L. Eichhorn G. L. & Marzilli L. G. (1988): Advances in Bioinorganic Chemistry. Vol. 7, Elsevier, New York, 1
- [26] **Hillar A.**, Nicholls P. (1992): The mechanism of inhibition of catalase compound II formation by NADPH. FEBS Lett. **314**, 179-182
- [27] **Stern K. G.** (1936): On the Mechanism of enzyme action. J. Biol. Chem. **114**, 473-494
- [28] **Lemberg R.**, Foulkes E. C. (1948): Reaction between catalase and hydrogen peroxide. Nature **161**, 131

- [29] **Keilin D.**, Hartree E. F. (1951): Purification of horse-radish peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin. *Biochemical Journal* **49**, 88-104
- [30] **Chance B.** (1952): The spectra of the enzyme-substrate complexes of catalase and peroxidase. *ABB* **41**, 404-415
- [31] **Kono Y.**, Fridovich I. (1982): Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* **257**, 5751-5754
- [32] **Lardinois O. M.** (1995): Reactions of bovine liver catalase with superoxide radicals and hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.* **22**, 251-274
- [33] **Kirkman H. N.**, Galiano S., Gaetani G. F. (1987): The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* **262**, 660-666
- [34] **Schroeder W. A.**, Shelton J. R., Shelton J. B., Robberson B., Appel G. (1969): The amino acid sequence of bovine liver catalase: a preliminary report. *Arch. Biochem. Biophys* **131**, 653-655
- [35] **Wucherpennig, G.** (1992): Adsorptionsverhalten von Rinderleberkatalase an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen. Dissertation am Institut der Technischen Chemie der Technischen Universität München
- [36] **Amara P.**, Andreoletti P. (2001): Ligand diffusion in the catalase from *Proteus mirabilis*: a molecular dynamics study. *Protein Sci.* **10**, 1927-1935
- [37] **Furuta H.**, Hachimori A., Ohta Y., Samejima T. (1974): Dissociation of bovine liver catalase into subunits on acetylation. *J. Biochem.* **76**, 481-491
- [38] **Chang J. Y.**, Schroeder W. A. (1972): Reaction of 3-amino-1:2:4-triazole with bovine liver catalase and human erythrocyte catalase. *Arch. Biochem. Biophys.* **148**, 505-508
- [39] **Schroeder W. A.** et al. (1964): Some amino acid sequences in bovine liver catalase. *Biophys. Acta*, **89**, 47-65
- [40] **Tanford C.**, Lovrien R. (1962): Dissociation of catalase into subunits. *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1892-1896
- [41] **Boehringer Mannheim GMBH** (1975): Biochemica Information II. 45
- [42] **Kirkman H. N.**, Gaetani G. F. (1984): Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc.Natl.Acad.Sci.* **81**, 4343-4347
- [43] **Malmon A. G.** (1957): Small angle x-ray scattering studies of the size, shape, and hydration of catalase. *Biochim. Biophysiol. Acta* **26**, 233-240
- [44] **Fita I.**, Rossmann M. G. (1985): The active center of catalase. *J. Biol. Chem.* **185**, 21-37

- [45] **Fleischer E. B.** (1970): Structure of porphyrins and metalloporphyrins. *Acc. Chem. Res.* **3**, 105-112
- [46] **D. Shemin** in N. O. Kaplan & A. Robinson (1982): *From Cylcotrons to Cytochromes*. London/New York, Academic Press, 117-129
- [47] **Y. Maeda**, A. Trautwein, U. Gonser, K. Yoshida, K. Kikuchi-Torii, T. Homma, Y. Ogura (1973): Mossbauer effect in bacterial catalase. *Biochimica et Biophysica Acta* **303**, 230-236
- [48] **Torii K.**, Ogura Y. (1969): Electron paramagnetic resonance study of bovine liver catalase. *J. Biochem.* **65**, 825-827
- [49] **'Carra P. O.**, in Smith K. M. (1975): *Prophyrins and Metalloporphyrins*. **124**, Elsevier, Scientific Publishing Company, Amsterdam
- [50] **Vainshtein B. K.**, Melik-Adamyan W. R., Barynin V. V., Vagin A. A., Grebenko A. I. (1981): Three-dimensional structure of the enzyme catalase. *Nature* **293**, 411-412
- [51] **Melik-Adamyan W. R.**, Barynin V. V. (1986): Comparison of beef liver and *Penicillium vitale* catalases. 188, *Journal of Molecular Biology*, 63-72
- [52] **Murshudov G. N.**, Melik-Adamyan W. R., Grebenko A. I., Barynin V. V., Vagin A. A., Vainshtein B. K., Dauter Z., Wilson K. S. (1992): Three-dimensional structure of catalase from *Micrococcus lysodeikticus* at 1.5 Å resolution. *FEBS Letters* **312**, 127-131
- [53] **Gouet P.**, Jouve H. M., Dideberg O. (1995): Crystal structure of *Proteus mirabilis* PR catalase with and without bound NADPH. *J. Mol. Biol.* **249**, 933-954
- [54] **Bravo J.**, Maté M. J., Schneider T., Switala J., Wilson J., Loewen P. C., Fita I. (1999): Structure of catalase HP11 from *Escherichia coli* at 1.9 Å resolution. *Protein Struc. Funct. Genet.* **34**, 155-166
- [55] **Maté M. J.**, Zamocky M., Nykyri L. M., Herzog C., Alzari P. M., Betzel C., Koller F., Fita I. (1999): Structure of catalase A from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **286**, 135-149
- [56] **Sevinc M. S.**, Maté M. J., Switala J., Fita I., Loewen P. C. (1999): Role of the lateral channel in catalase HP11 of *Escherichia coli*. *Protein Sci.* **8**, 490-498
- [57] **Douglas S.**, Criddle R., Breidenbach R. (1973): Charakterization of deoxyribonucleic acid species from castor bean endosperm. Inability to detect a unique deoxyribonucleic acid species associated with glycosomes. *Plant Physiol.* **51**, 902-906
- [58] **Sjöling S.**, Glaser E. (1998): Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends in Plant Science* **3**, 136-140
- [59] **Kragler F.**, Langeder A., Binder M., Hartig A. (1993): Two independent peroxisomal targeting signals in catalase A of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* **120**, 665-673

- [60] **Trelease R.**, Xie W., Lee M., Mullen R. (1996): Rat liver catalase is sorted to peroxisomes by its C-terminal tripeptide Ala-Asn-Leu, not by the internal Ser-Lys-Leu motif. *European Journal of Cell Biology* 71, 248-258
- [61] **Purdue P.**, Lazarow P. (1996): Peroxisomal biogenesis: multiple pathways of protein import. *The Journal of Cell Biology* **134**, 849-862
- [62] **Petrova V.**, Drescher A., Kujumdzieva A., Schmitt M. (2004): Dual targeting of yeast catalase A to peroxisomes and mitochondria. *Biochem. J.* **380**, 393-400
- [63] **Putman C.**, Arvai A., Bourne Y., Tainer J. (2000): Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *Journal of Molecular Biology* **296**, 295-309
- [64] **Calabrese E. J.**, Canada A. T. (1989): Catalase: its role in xenobiotic detoxification. *Pharmac. Ther.* **44**, 297-307
- [65] **Schornmüller J.**, in Bergmeyer U. (1970): Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, 77
- [66] **Shaked Z.**, Wolfe S., in Mosbacher K. (1988): Methods in Enzymology. **137**, Academic Press, Inc., 599
- [67] **Bonnichsen R. K.**, Chance B., Theorell H. (1947): Catalase activity. *Acta chem. Scand.* **1**(8), 685-709
- [68] **Feinstein R. N.** (1949): Perborate as substrate. in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.* **180**, 1197-1202
- [69] **Takahara S.**, Hamilton H. B., Neel J. V., Kobara T. Y., Ogura Y., Nishimura E. T. (1960) *J. Clin. Invest.* **39**, 610-619
- [70] **Bergmayer H. U.** (1955) *Biochem. Z.* **327**, 255 (42)
- [71] **Werner E.**, Heider H. (1963): Katalaseaktivitätsbestimmung im Blut. *Z. klin. Chem.* **1**, 115 (26)
- [72] **Hübl P.**, Bretschneider R. (1964): Die Titanylulfatmethode zur Bestimmung der Katalase im Blut, Serum und Harn. *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **335**, 146-155
- [73] **Pilz W.**, Johann J. (1965): Spezielle analytische Methoden für die Biochemie und physiologische Chemie *Z. analyt. Chem.* **210**, 358
- [74] **Warburg O.**, Krippahl G. (1963): Chemistry of photosynthesis. *Z. Naturforschung* **18b**, 837-44.
- [75] **Perschke H.**, Broda E. (1961): Determination of Very Small Amounts of Hydrogen Peroxide. *Nature* **190**, 257-258

- [76] **Keston A. S.**, Brandt R. (1965): The fluorometric analysis of ultramicro-quantities of hydrogen peroxide Anal. Biochem. **11**, 1-5
- [77] **Jacob H. E.** (1964): Katalaseaktivitätsbestimmungen von Mikroorganismen mit Hilfe der Polarographie. Z. Chem. **4**, 189-190
- [78] **Ogata M.** (1964): Symposium on Genetics and Biochemistry of Acatlasemia, IX Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics at Wakayama Medical College
- [79] **Rørth M.**, Jensen P. K. (1967): Determination of catalase activity by means of the Clark oxygen electrode. Biochem. Biophys. Acta **139**, 171-173
- [80] **Kirk J. E.** (1963): A rapid procedure for catalase determination in blood and tissue samples with the van Slyke manometric apparatus. Clin. Chem. **9**, 763-775
- [81] **Gagnon M.**, Hunting W. M., Esselen W. B. (1959): New methods for catalase determination. Anal. Chem. **31**, 144-146
- [82] **Higahsi T.**, Yagi M., Hirai H. (1961): Calorimetric estimation of catalase activity. J. Biochem. Tokyo **49**, 707
- [83] **Ben-Yoseph Y.**, Shapira E. (1973): Specific immunoassay for quantitative determination of human erythrocyte catalase. J. Lab. Clin. Med. **81**(1), 133-139
- [84] **Landahl H. D.** (1953): Calorimetric estimation of catalase activity. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **84**, 74-79
- [85] **Chance B.** (1950): The reaction of catalase in the presence of the notain system. Biochem. J. **46**, 387-402
- [86] **Henderson L. M.**, Chappell J. B. (1993): Dihydrorhodamine 123: A fluorescent probe for superoxide generation? Eur. J. Biochem. **217**, 973-980
- [87] **Kirsch M.**, Auferkamp O., de Groot H., et al. noch nicht fertig gestellt
- [88] **Andreoletti P.**, Gambarelli S., Sainz G., Stojanoff V., White C., Desfonds G., Gagnon J., Gaillard J., Jouve H. M. (2001): Formation of a tyrosyl radical intermediate in *Proteus mirabilis* catalase by directed mutagenesis and consequences for nucleotide reactivity. Biochemistry **40**, 13734-13743
- [89] **Chance B.** (1950): On the evidence for a ternary complex of catalase hydrogen peroxide with alcohols. J. Biol. Chem. **182**, 649-658
- [90] **Keilin D.**, Hartree E. F. (1945): Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. Biochem. J. **39**, 293-301
- [91] **Keilin D.**, Hartree E. F. (1955): Catalase, peroxidase, and metmyoglobin as catalysts of coupled peroxidatic reactions Biochem. J. **60**, 310-325
- [92] **Marks G. W.** (1936): The effect of glutathione and other substances on the inactivation of catalases. J. Biol. Chem. **115**, 299-314

- [93] **Davison A. J.**, Kettle A. J., Fatur D. J. (1986): Mechanism of the inhibition of catalase by ascorbate. Roles of active oxygen species, copper and semidehydroascorbate. *J. Biol. Chem.* **261**, 1193-1200
- [94] **Sugadev R.**, Balasundaresan D., Ponnuswamy M. N., Kumaran D., Swaminathan S., Sekar K. (2004): Rasmol Struktur von Rinderkatalase (Röntgenstruktur ohne NADPH), ITGU
- [95] **Chance B.**, Sies H., Boveris A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* **59**, 527-605
- [96] **Hillar A.**, Nicholls P., Switala J., Loewen P. C. (1994): NADPH binding and control of catalase compound II formation: comparison of bovine, yeast and *Escherichia coli* enzymes. *Biochem. J.* **300**, 531-539
- [97] **Ivancich A.**, Jouve H. M., Gaillard J. (1997): Mechanism of one-electron oxidation of NAD(P)H and function of NADPH bound to catalase. *Biochemistry* **36**, 9356-9364
- [98] **Bicout D. J.**, Field M. J., Gouet P., Jouve H. M. (1995): Simulations of electron transfer in the NADPH-bound catalase from *Proteus mirabilis* PR. *Biochim. Biophys. Acta* **1252**, 172-176
- [99] **Olson L. P.**, Bruce T. C. (1995): Electron tunneling and ab initio calculations related to the one-electron oxidation of NAD(P)H bound to catalase. *Biochemistry* **34**, 7335-7347
- [100] **Almarsson Ö.**, Sinha A., Gopinath E., Bruce T. C. (1993): Mechanism of one-electron oxidation of NAD(P)H and function of NADPH bound to catalase. *J. Am. Chem. Soc.* **115**, 7093-7102
- [101] **Page C. C.**, Moser C.C., Chen X., Dutton P. L. (1999): Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47-52
- [102] **Neumüller O.** in: Römpp Chemikalienlexikon (1979) **394**, Franck'sche Verlagshandlung, Stuttgart, Bd. 1
- [103] **Truesdale G. A.**, Downing A. L. (1954): Solubility of oxygen in water. *Nature* **173**, 1236-1236
- [104] **Bergmeyer H. U.**, in Grassl M. & Walter H. E. (1983): Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer H. U., ed.). 3rd Ed., Vol. **2**, Verlag Chemie, Weinheim, W-Germany – Deerfeld Beach, FL., 201-202

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

%.....	Prozent
~.....	Circa
°C.....	Temperatur in Grad Celsius
Å.....	Ångström
Abb.	Abbildung
AH ₂	Wasserstoffdonator
aq. dest.....	destilliertes Wasser
Bd.	Band
BLC.....	Rinderleberkatalase (bovine liver catalase)
bzw.	beziehungsweise
CoA.....	Coenzym-A
Da.....	Dalton
DFG.....	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA.....	Desoxyribonucleinsäure
DTPA.....	Diäthylentriaminpentaessigsäure
E.C.	Enzyme Commission numbers
E _{xnm}	Extinktion bei einer Wellenlänge von X nm
g.....	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
Gl.	Gleichung
GOD.....	Glucoseoxidase
h.....	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
I.....	Strom
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration (inhibitory concentration)
k.....	Geschwindigkeitskonstante [M ⁻¹ s ⁻¹]
k _{app}	Geschwindigkeitskonstante (Abbau)
l.....	Liter
Lyophyll.	lyophyllisiert
M.....	Molar
<i>m. lysodeiticus</i>	<i>Micrococcus lysodeiticus</i>
min.....	Minute
NADH.....	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH.....	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
ORD.....	optisches Rotationsdispersions Verfahren
pH.....	potentia Hydrogenii
POD.....	Peroxidase
PTS.....	peroximale Targeting Sequenz
<i>r. sphaeroides</i>	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>
ROS.....	Reaktive-Sauerstoff-Spezies
rpm.....	Umdrehungen pro Minute
R-S-S-R.....	Disulfidbrücke

Anhang

s.....	Sekunde
SFB.....	Sonder Forschungs-Bericht
SH.....	Sulfidgruppe
Susp.	Suspension
Tab.	Tabelle
U.....	Units
U.....	Spannung
V.....	Volt
vgl.	vergleiche
Δ.....	Delta

8.2. Konstanten

SI-Vorsätze für dezimale Vielfache bzw. Teile

Yotta	Y	10^{24}
Zetta	Z	10^{21}
Exa	E	10^{18}
Peta	P	10^{15}
Tera	T	10^{12}
Giga	G	10^9
Kilo	K	10^6
Milli	m	10^{-3}
Mikro	μ	10^{-6}
Nano	n	10^{-9}
Piko	p	10^{-12}
Femto	f	10^{-15}
Atto	a	10^{-18}
Zepto	z	10^{-21}
Yocto	y	10^{-24}

8.3. Extinktionskoeffizienten der eingesetzten Substanzen

Substanz	Wellenlänge	Einheit	Dimension
Ferrikatalase	405 nm	$M^{-1} cm^{-1}$	$3,24 \times 10^{-5}$
Compound-I	660 nm	$mM^{-1} cm^{-1}$	5,7
Compound-II	435 nm	$mM^{-1} cm^{-1}$	32
Rhodamin-123	500 nm	$M^{-1} cm^{-1}$	78800
L-Ascorbinsäure	265 nm	$mM^{-1} cm^{-1}$	7,0
Wasserstoffperoxid	240 nm	$M^{-1} cm^{-1}$	43,6
NADPH	340 nm	$M^{-1} cm^{-1}$	$6,3 \times 10^{-3}$

8.4. Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

Hersteller	Chemikalie, Verbrauchsmaterial, Gerät
Sigma	KH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ Xanthin, Glucose H ₃ PO ₄ , H ₂ O ₂ DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid) Chelex-100 (Iminodiacetic-acid) Ascorbinsäure, Peressigsäure
Amicon	Amplex-Red, Resorufin
Falcon	50 ml Kunststoffröhrchen
Eppendorf	Reaktionsgefäße 50, 1000 u. 2000 µl
Roche Molecular Biochemicals	BLC-Katalase Xanthinoxidase (aus Kuhmilch) Glucoseoxidase (aus <i>Aspergillus niger</i>) Glucose-6-Phosphatdehydrogenas Superoxiddismutase (aus Rindererythrocyten) NADPH, NADPH
Riedel de Haën	Ethanol, Methanol
Molecular Probes	Amplex-red, Resorufin
TKA-Lab	Wasseraufbereitungsanlage Typ HP6UV/UF

8.5. Literaturliste beteiligter Veröffentlichungen

(1) Kirsch M., Auferkamp O., de Groot H., et al. (in Arbeit)

(2) de Groot H., Auferkamp O., Bramey T., de Groot K., Kirsch M., Korth H. G., F. Petrat F., Sustmann R. (2006) Free Radic. Res. **40**, 67-74

9. Curriculum vitae

geb. am/in	02.05.1974 / Wattenscheid –heute Bochum–
Ausbildung -schulisch-	<p>1981 – 1985 Gemeinschaftsgrundschule Preins Feld, Bochum- Wattenscheid</p> <p>1985 – 1994 Erich Kästner-Schule, Bochum</p> <p>25.05.1994 Erwerb der Hochschulreife (Abitur)</p>
Ausbildung -beruflich-	<p>1994 Beginn Studium Biologie Ruhr Universität Bochum, Fakultät für Biologie</p> <p>26.03.1998 Diplomvorprüfung</p> <p>10.09.2002 Diplom (Gesamtnote sehr gut)</p> <p>2003–2006 Wissenschaftlicher Angestellter / Promotionsstudent am Universitäts- klinikum Essen</p>